

# **Konditionale Mutagenese in der Maus**

## **Generierung und Analyse**

### **konditionaler Mausmutanten**

Von dem Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

**von Anne Monika Fleige**  
aus Hildesheim

1. Referentin oder Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referentin oder Referent: Prof. Dr. Stefan Dübel

eingereicht am: 05. 09. 2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 20. 12. 2005

Druckjahr 2006

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Allgemeine Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.2.1	Die Maus als Modellorganismus .....	2
1.2.2	Signaltransduktion im Immunsystem: Interleukin 12 (IL-12) und Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) .....	3
1.2.3	Die IL-12 Zytokinfamilie .....	8
1.2.4	Phänotyp der konventionellen Knockouts für die IL-12-Untereinheiten p40 ( <i>p40</i> <sup>-/-</sup> ) und p35 ( <i>p35</i> <sup>-/-</sup> ) .....	10
1.2.5	Phänotyp der konventionellen Knockouts für den IFN $\gamma$ -Rezeptor ( <i>Ifngr1</i> <sup>-/-</sup> und <i>Ifngr2</i> <sup>-/-</sup> ) .....	10
1.2.6	Serum Response Factor (SRF) .....	11
1.2.7	Phänotyp des konventionellen Knockouts für <i>Srf</i> .....	15
1.2.8	Konditionale Mutagenese der Maus .....	16
1.2.9	Herstellung von Targeting Vektoren unter Verwendung der Technik des ET Klonierens .....	19
<b>1.3</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien allgemein .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Material in der Zellkultur .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Zelllinien .....</b>	<b>22</b>
2.3.1	Murine embryonale Feederzellen mit Neomycinresistenz .....	22
2.3.2	Murine embryonale Stammzellen .....	22
<b>2.4</b>	<b>Medien für die Zellkultur .....</b>	<b>23</b>
2.4.1	Medium für murine embryonale Stammzellen .....	23
2.4.2	Einfriermedium für ES-Zellen .....	23
<b>2.5</b>	<b>Zellkulturtechniken .....</b>	<b>23</b>
2.5.1	Auftauen von ES-Zellen .....	23
2.5.2	Transfektion von ES-Zellen .....	23
2.5.3	Isolierung von ES-Zell Klonen .....	24
2.5.4	Einfrieren von ES-Zellen in 96 Loch Platten zur Lagerung der ES-Zell-Klone .....	24
<b>2.6</b>	<b>Molekularbiologische Standardmethoden .....</b>	<b>25</b>
2.6.1	DNA-Isolierung .....	25
2.6.2	Restriktionsverdaus .....	25
2.6.3	Isolierung und Spaltung von genomischer DNA aus murinen ES-Zellen in 96 Loch-Platten .....	25
2.6.4	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen .....	26
2.6.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	26
2.6.5.1	PCR zur Genotypisierung von SRF Mutanten und CD19-Cre Mäusen .....	26
2.6.6	Southern-Blot und Hybridisierung .....	27
2.6.7	DNA-Sonden .....	27
2.6.8	Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde .....	27

2.6.9	Hybridisierung und Detektion .....	27
2.6.10	Koloniehybridisierung.....	28
2.6.11	Klassische Klonierung von DNA und ET Klonierung .....	28
2.6.11.1	Integration einer geflochten Neokassette und einer Restriktionsschnittstelle in ein subkloniertes Genfragment mittels ET Klonierung .....	28
2.6.12	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	29
<b>2.7</b>	<b>Bakterien .....</b>	<b>30</b>
2.7.1	Escherichia coli Zelllinien.....	30
2.7.2	Cre exprimierende E.coli.....	30
2.7.3	Flp exprimierende E.coli .....	30
2.7.4	Bakterienmedien: .....	30
2.7.5	Verwendete Antibiotika: .....	30
<b>2.8</b>	<b>Arbeiten mit primären murinen Zellen .....</b>	<b>30</b>
2.8.1	Verwendete Mauslinien.....	31
2.8.2	Entnahme von Blut und Herstellung von Serum.....	31
2.8.3	Isolierung von Milzzellen.....	31
2.8.4	Isolierung von Zellen der inguinalen Lymphknoten, mesenterialen Lymphknoten und Peyerschen Platten.....	32
2.8.5	Isolierung von Zellen des Peritoneums (PECs).....	32
2.8.6	Isolierung von Knochenmarkszellen (BM) .....	32
2.8.7	Antikörperfärbungen für FACS-Analysen .....	33
2.8.8	Antikörper in der FACS-Analyse.....	33
2.8.8.1	Mix zum Sortieren .....	35
2.8.8.2	Mix für hämatopoietische Zellen .....	35
2.8.8.3	Marginalzonen B-Zell Mix.....	35
2.8.8.4	CXCR4-Mix .....	35
2.8.8.5	CD48-Mix .....	35
2.8.8.6	$\beta$ -1/-7 Integrin- Mix .....	35
2.8.8.7	CD5- Mix .....	35
2.8.8.8	IgM/ IgD Mix .....	35
2.8.8.9	ICAM-2 Mix .....	35
2.8.8.10	CD22-Mix .....	35
2.8.9	Antikörperkonjugation .....	35
2.8.10	Isolierung von RNA für mRNA Arrays .....	36
2.8.11	Messung der Kalzium-Mobilisierung.....	36
2.8.12	Bestimmung des Serum-Immunglobulingehalts .....	36
2.8.13	FACS-Geräte .....	37
<b>2.9</b>	<b>Histologische Untersuchungen .....</b>	<b>37</b>
2.9.1	Antikörper in der Histologie .....	37
2.9.2	Entnahme und Aufarbeitung von Organen für Parafinschnitte .....	37
2.9.3	Entnahme und Aufarbeitung von Organen für Kryoschnitte .....	37
2.9.4	Anfertigung von Kryoschnitten.....	37
2.9.5	Antikörperfärbung auf Kryoschnitten .....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung von <i>targeting</i>-Konstrukten zur konditionalen Mutagenese unter Verwendung der Technik des ET Klonierens.....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Herstellung des IL-12/Il-23 p40 <i>targeting</i> -Konstrukts .....	40
3.1.2	Herstellung des Ifngr2 <i>targeting</i> -Konstrukts .....	46

<b>3.2</b>	<b>Erzeugung und Analyse der B-zell-spezifischen Inaktivierung von SRF in Mäusen.....</b>	<b>50</b>
3.2.1	Deletionsgrad und B-Zellentwicklung in <i>Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/Cre</sup></i> Mäusen .....	51
3.2.2	Vergleichende Analyse der Expression von IgM und IgD .....	55
3.2.3	Vergleichende Analyse der Expression von CD19 .....	58
3.2.4	Histologische Untersuchungen.....	59
3.2.5	Analyse der Peritonealzellen.....	62
3.2.6	Messung der basalen Immunglobulinkonzentration im Blutserum.....	64
3.2.7	Kalzium-Mobilisierung .....	65
3.2.8	Vergleichende Analyse der Expression von $\beta_1$ - und $\beta_7$ - Integrin.....	66
3.2.9	Analyse der Genexpression in B-Zellen mittels RNA-Arrays .....	67
3.2.10	Vergleichende Analyse der Expression von CD22 .....	70
3.2.11	Vergleichende Analyse der CXCR4-Expression .....	71
3.2.12	Vergleichende Analyse der ICAM-2-Expression .....	72
3.2.13	Vergleichende Analyse der CD48-Expression.....	73
3.2.14	Zusammenfassung .....	74
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Verwendung der Technik des ET-Klonierens zur Erzeugung von <i>targeting</i>-Konstrukten für die konditionelle Mutagenese .....</b>	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>Phänotypische Analyse der Auswirkungen der Deletion von <i>Srf</i> in B-Zellen .....</b>	<b>81</b>
4.2.1	Analyse der Expression von IgM und IgD.....	82
4.2.2	Verlust von MZB in <i>Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/cre</sup></i> Mäusen .....	82
4.2.3	Reduktion der CD5 <sup>+</sup> B1-Zellpopulation im Peritoneum.....	85
4.2.4	Untersuchungen von B-Zell-Funktionen <i>in vitro</i> .....	85
4.2.5	Vergleichende Analyse der Genexpression von Wildtyp-Mäusen und Mutanten auf RNA-Ebene und Proteinebene .....	86
4.2.6	Expression von Adhäsionsmolekülen .....	88
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>104</b>
<b>6.1</b>	<b>Primer für <i>Il-12p40</i> .....</b>	<b>104</b>
6.1.1	Sequenzierungsprimer .....	104
6.1.2	Primer zur Verifizierung der BACs und der Subklonierung.....	104
6.1.3	ET Klonierungsprimer.....	105
6.1.4	Primer zur Verlängerung des 3' Arms .....	105
6.1.5	Primer zur Erzeugung der 5' und 3' Sonde.....	105
<b>6.2</b>	<b>Primer für <i>Ifngr2</i> .....</b>	<b>106</b>
6.2.1	Sequenzierungsprimer .....	106
6.2.2	Primer zur Verifizierung der BACs .....	106
6.2.3	ET Klonierungsprimer.....	106
6.2.4	Primer zur Erzeugung der 5' und 3' Sonde für Southernhybridisierungen.....	106
<b>6.3</b>	<b>SRF Primer .....</b>	<b>107</b>
6.3.1	SRF Genotypisierungsprimer .....	107
6.3.2	Cre Genotypisierungsprimer: .....	107
<b>6.4</b>	<b>Matrizen für PCRs .....</b>	<b>108</b>

6.4.1	pgkneoloxP.....	108
6.4.2	pgkneoFRTmut.....	109
6.4.2.1	mutierte FRT Sequenz (FRT3 oder auch M8)(154).....	109
6.4.3	pCAPsneoloxP .....	110
<b>6.5</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>111</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist die Erzeugung und Analyse von konditionalen Mausmutanten zur Aufklärung der Funktion spezifischer immunologischer Abwehrmechanismen.

## **1.2 Allgemeine Einleitung**

Das Immunsystem wird von spezialisierten Zellen gebildet, die sich in der Peripherie des Körpers oder in den Lymphorganen ansiedeln und in der Lage sind, zwischen körpereigen und fremd zu unterscheiden. Eindringene Erreger können so erkannt und bekämpft werden. Die Zellen, die das Immunsystem bilden, sind hämatopoietischen Ursprungs und ihre Vorläuferzellen befinden sich bei adulten Säugetieren im Knochenmark. Vereinfacht kann man zwischen einem angeborenen und einem erworbenen Teil des Immunsystems unterscheiden. In beiden Systemen gibt es spezialisierte Zellen, die über direkte Interaktionen von Oberflächenmolekülen sowie die Ausschüttung von Botenstoffen wie Zytokinen miteinander kommunizieren. Der Begriff Zytokin ist ein Sammelbegriff für alle von Zellen sezernierten Peptidmoleküle mit regulatorischen Effekten, er umfasst daher eine heterogene Gruppe von Molekülen.

Angeborenes und erworbenes Immunsystem agieren nicht unabhängig voneinander, sondern ergänzen und beeinflussen sich gegenseitig.

Die wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems sind phagozytierenden Zellen wie Neutrophile, Granulozyten und Makrophagen. Diese Zellen erkennen Erreger über sehr allgemeine und wiederkehrende Strukturen z.B. auf der Oberfläche der Pathogene (sog. PAMPS= „pathogen associated molecular patterns“), phagozytieren Erreger und sezernieren Botenstoffe, die weitere Immunzellen anlocken und aktivieren. Dieser Teil des Immunsystems kann sehr schnell aktiviert werden und bildet so eine erste Verteidigungslinie. Die erworbene Immunität wird von T- und B-Zellen vermittelt. Jede dieser Zellen besitzt eine eigene und einzigartige Antigenspezifität, die durch Umlagerungen in den Immunglobulinloci während der Entwicklung dieser Zellen zu Stande kommt. Nur der Kontakt mit dem passenden Antigen führt zur Aktivierung dieser Zellen und deren Vermehrung (sog. klonale Expansion). Die verschiedenen T-Zellpopulationen haben dabei als zytotoxische T-Zellen die Aufgabe befallene körpereigene Zellen abzutöten oder als T-Helferzellen die B-Zellen zur Produktion von spezifischen Antikörpern anzuregen. Eine spezifische Immunantwort ist

effektiver, benötigt aber eine gewisse Zeit um wirksam zu werden. T- und B-Zellen können jedoch Gedächtniszellen bilden, die beim erneuten Kontakt mit einem Erreger eine schnellere spezifische Immunantwort ermöglichen.

Signalmoleküle sind entscheidend an der Regulation der Immunabwehr beteiligt. Zytokine und Chemokine werden als Reaktion auf den Kontakt mit einem Erreger von vielen Zelltypen gebildet und sezerniert. Sie können autokrin die Zellaktivität in einer positive Rückkopplung verstärken, oder parakrin umliegende Zellen aktivieren. Im Fall von Chemokinen können sie weitere Immunzellen anlocken. Zytokine haben sehr unterschiedliche Wirkungen, unter anderem können sie die Proliferation von Zellen stimulieren oder hemmen, oder als Differenzierungsfaktoren für bestimmte Zelltypen wirken. Wie alle Signalmoleküle binden sie auf der Zielzelle an spezifische Rezeptoren, wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird, die immer eine Veränderung der transkriptionellen Aktivität der Zelle zur Folge hat. Die Transkription von Genen wird durch das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren, spezifischen Bindungssequenzen auf der DNA und der Konformation der DNA reguliert. Neben den Signalen, die über Zytokine vermittelt werden, spielen die Signale, die über die spezifischen T- und B-Zell-Rezeptoren vermittelt werden, im Immunsystem eine wichtige Rolle. Jeder dieser Rezeptoren besitzt eine eigene Spezifität, die durch die Rearrangements der Immunglobulinloci während der Entwicklung von T- und B-Zellen entsteht. Die Signale, die über diese Rezeptoren vermittelt werden, dienen während der Entwicklung zur Selektion von Zellen mit geeigneten Rezeptoren. Später führt die Bindung des passenden Antigens an den Rezeptor zusammen mit weiteren Kofaktoren, wie z.B. Zytokinen, zur Aktivierung der T- und B-Zellen. Die Signale werden dabei ebenfalls in der Zelle in eine Veränderung der Genregulation übersetzt, wirken also letztlich auf die Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren.

### 1.2.1 Die Maus als Modellorganismus

Die Erforschung der verschiedenen Komponenten des Immunsystems und deren Regulation sowie der Mechanismen, die zum Versagen des Immunsystems führen, ist ohne die Verwendung der Maus als Modellorganismus undenkbar.

Mensch und Maus besitzen ein zu ca. 95 % übereinstimmendes Genom und auch das Immunsystem der Maus weist eine große Ähnlichkeit zu dem des Menschen auf. Viele beim Menschen bekannte Krankheiten finden sich auch bei Mäusen und lassen sich in diesen induzieren, so dass zumindest ein Teil der an Mäusen gewonnenen Daten auf immunologische Prozesse beim Menschen übertragbar ist. Darüber hinaus lassen sich Mäuse



relativ einfach züchten und halten. Außerdem gewährleisten verschiedene Inzuchtstämme eine gute Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, da die Mäuse wie Klone keine genetischen Unterschiede aufweisen. Der größte Vorteil ergibt sich jedoch aus der Möglichkeit, gezielt Veränderung in das Mausgenom einzuführen und deren Wirkung *in vivo* zu beobachten. Sind durch die Mutation beide Allele eines Gens vollständig inaktiviert, so dass kein funktionales Protein gebildet werden kann, spricht man von einer Knockout Maus. Solche Mausmutanten können auf die phänotypischen Auswirkungen eines bestimmten Genverlusts untersucht werden. Bei Genen, deren vollständiger Verlust zu einem letalen Defekt führt sowie für besondere Fragestellungen, haben sich sogenannte konditionale Mutanten bewährt. In diesen Tieren ist das Zielgen oder Teile davon, z.B. ein Exon in beiden Allelen von zwei Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase flankiert (sog. loxP Sequenzen). Man spricht deshalb auch von einem geflochtenen Allel. Durch die Insertion der loxP-Sequenzen in nicht kodierende Bereiche des Gens bleibt dieses intakt und verursacht keinen Phänotyp. Erst die Expression der Cre-Rekombinase in der gleichen Zelle führt zum Verlust des DNA-Abschnitts, der zwischen den loxP Sequenzen liegt und somit zur Inaktivierung des betroffenen Gens (s. Kap. 1.2.8). Es gibt verschiedene Mauslinien, bei denen Cre unter der Kontrolle zelltypspezifischer oder induzierbarer Promotoren exprimiert wird, wobei die Induktion ubiquitär oder gewebsspezifisch erfolgen kann. Die konditionale Mutagenese hat den Vorteil, Gene gezielt in bestimmten Zelltypen auszuschalten und die Auswirkungen zu verfolgen. Im Immunsystem bietet dies die Möglichkeit, die biologisch relevanten Zellen für bestimmte Vorgänge zu identifizieren, in dem z. B. ein Gen gezielt nur in Makrophagen oder in T-Zellen ausgeschaltet wird.

### **1.2.2 Signaltransduktion im Immunsystem: Interleukin 12 (IL-12) und Interferon gamma (IFN $\gamma$ )**

IL-12 und IFN $\gamma$  gehören zur Gruppe der Zytokine. Interleukin ist ein historischer Begriff und bezieht sich auf Signalmoleküle, die der Kommunikation zwischen Leukozyten dienen. Diese enge Definition des Begriffs ist so nicht mehr gültig, da verschiedene Interleukine auch Signale an Zellen weitergeben, die nicht zum hämatopoietischen System gehören. Zytokine und ihre spezifischen Rezeptoren werden aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in verschiedene Familien eingeteilt. Bei den Zytokinen unterscheidet man die Familien der Hämopoietine, Interferone, Chemokine und der Tumornekrosefaktoren. Die Zytokin-Rezeptoren verteilen sich auf die Gruppe der Zytokin-Rezeptorfamilie-1 oder auch

Hämatopoietin-Rezeptor-Superfamilie, die Gruppe der Zytokin-Rezeptor-Familie-2 oder Interferon-Rezeptor-Superfamilie und die Tumornekrosefaktor-Rezeptoren.

Zytokine und die Familie der Chemokine bilden die Grundlage für die Kommunikation der Zellen, die an der Immunabwehr beteiligt sind. Wie bereits beschrieben, kann man das Immunsystem in die angeborene oder unspezifische Immunabwehr und die erworbene oder spezifische Immunabwehr einteilen. Für beide Teile gibt es spezialisierte Zellen und auch spezielle Zytokine, die kennzeichnend für die Art der Immunreaktion sind. IL-12 und IFN $\gamma$  gehören zu den sogenannten Typ I oder proinflammatorischen Zytokinen, die mit der zellulären angeborenen Immunität assoziiert sind und die Entstehung einer Entzündungsreaktion fördern.

Hauptproduzenten von IL-12 sind phagozytierende Zellen wie Makrophagen und Neutrophile, welche die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Erreger darstellen sowie Dendritische Zellen (DC), deren Funktion in der Präsentation von Antigenen und Aktivierung von T-Zellen liegt.

Das Eindringen eines Erregers wird zunächst vom unspezifischen Immunsystem erkannt. Die daran beteiligten phagozytierenden Zellen wie Granulozyten und Makrophagen und die Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen schütten daraufhin als eines der ersten Zytokine IL-12 aus (7-10). IL-12 ist das erste identifizierte heterodimere Zytokin. Es besteht aus den beiden Untereinheiten p35 und p40, die kovalent miteinander verbunden sind.

Die DNA-Sequenzen beider Untereinheiten liegen sowohl in der Maus als auch beim Menschen auf unterschiedlichen Chromosomen und ihre Expression wird unabhängig voneinander reguliert.

Das murine Gen für p35 ist auf dem Chromosom 3 lokalisiert und enthält 7 Exone, das p40 Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert, auf dem auch weitere Zytokin-Gene in Clustern vorhanden sind und enthält 8 Exone, die über eine Länge von 14 kb verteilt sind (11, 12). IL-12 wird nur sezerniert, wenn beide Gene in einer Zelle transkribiert werden. Während die Expression von p35 in den unterschiedlichsten Zelltypen nachgewiesen werden konnte, ist die Expression von p40 auf die Zelltypen beschränkt, die auch IL-12 sezernieren können (13{Gubler, 1991 #1062, 14). Die p40 Untereinheit kann im Gegensatz zur p35 Untereinheit alleine sezerniert werden und bildet in Mäusen Homodimere. Diese können mit dem Rezeptor interagieren und so einen kompetitiven Inhibitor darstellen (15, 16). Die biologische Funktion der Homodimere ist jedoch umstritten.

Sequenzanalysen ergaben eine enge Verwandtschaft zwischen IL-12 und Interleukin-6 (IL-6). IL-6 bindet als Homodimer an seinen Rezeptor, der aus der Kette IL-6R $\alpha$  und einer gp130

Kette gebildet wird. Die gp130 Kette dient verschiedenen Interleukinrezeptoren als Signaltransduktionskette. Von IL-6R $\alpha$  gibt es zudem eine lösliche Form, die ebenfalls IL-6 binden und in dieser Form mit membrangebundenem gp130 assoziieren kann. Auf diese Weise können auch Zellen, die die IL-6R $\alpha$  Kette nicht exprimieren, empfindlich für IL-6 werden.

IL-12 p35 zeigt eine große Homologie zu IL-6, während p40 homolog zur Rezeptorkette IL-6R $\alpha$  ist. Die beiden IL-12 Rezeptorketten IL-12R1 und IL-12R2 wiederum sind homolog zu gp130. Diese Verwandtschaft lässt darauf schließen, dass sich IL-12 aus einer frühen Form von IL-6 und dessen löslichem Rezeptor entwickelt hat (17-19).

Die Zielzellen von IL-12 sind Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen. Diese exprimieren den IL-12 Rezeptor, der sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt. Die Untereinheiten werden aufgrund ihrer Homologie zu Zytokin-Rezeptoren vom  $\beta$ -Typ als IL-12R $\beta$ 1 und IL-12R $\beta$ 2 bezeichnet. Zur Gruppe dieser Rezeptoren gehört neben gp130 auch der *leukemia-inhibitory factor receptor* (LIF-Rezeptor) (20).

In Mäusen ist die IL-12R $\beta$ 1 Kette hauptsächlich für die Bindung des Liganden verantwortlich, während die  $\beta$ 2 Kette der Signaltransduktion dient (21, 22). Die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung einer sog. JAK -STAT Signalkaskade (Januskinase und *signaltransducer and activator of transcription*). Transphosphorylierung der rezeptorassoziierten Kinasen JAK2 und Tyk2 führt zur Bindung von vorwiegend STAT4 Molekülen, die ihrerseits phosphoryliert werden und dann als Homodimere im Kern die Transkription von Zielgenen wie z. B. IFN $\gamma$  fördern (23). Des Weiteren ist IL-12 an der Differenzierung und Proliferation von TH1-Zellen (24, 25), der Reifung von zytotoxischen T-Zellen (26) und der Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen (27, 28) beteiligt.

Auch wenn IL-12 ursprünglich aufgrund seiner steigernden Wirkung auf die Zytotoxizität von NK-Zellen (7) entdeckt wurde, so ist die wichtigste Funktion von IL-12 die Aktivierung der IFN $\gamma$ -Expression durch T-Zellen und NK-Zellen (29). IFN $\gamma$  wird auch als TypII Interferon bezeichnet, wodurch es von den TypI Interferonen Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) und Interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ ) unterschieden wird. Während die TypI Interferone untereinander eine große Homologie bezüglich der Aminosäuresequenz zeigen, so liegt nur eine geringe Homologie zu dem TypII Interferon IFN- $\gamma$  vor, allerdings können beide Typen Signale über STAT1 vermitteln (30). Während die Typ I Interferone eine starke antivirale Funktion haben, liegt die Hauptfunktion von IFN- $\gamma$  zusammen mit IL-12 in der Induktion und Aufrechterhaltung einer sogenannten TH1 Immunantwort. Die TH1 Immunantwort bezeichnet die Reaktion des Organismus vor allem auf intrazelluläre Erreger wie z.B. Mycobakterien, bei der sich aus naiven CD4<sup>+</sup> TH0 Zellen vermehrt TH1 Zellen entwickeln und gleichzeitig die Entwicklung

von TH2 Zellen gehemmt wird. TH1 und TH2 Zellen unterscheiden sich vor allem in den Zytokinen, die sie produzieren. TH1 Zellen sezernieren hauptsächlich  $\text{IFN}\gamma$ , Interleukin 2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF $\beta$ ), der auch als Lymphotoxin bezeichnet wird (31). Diese Zytokine wirken aktivierend auf Makrophagen, Natürliche Killerzellen, und Neutrophile, also auf die zellulären Komponenten der angeborenen Immunität. Die TH1 Antwort ist außerdem gekennzeichnet durch eine Aktivierung von zytotoxischen T Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen), sowie der Expression von Antikörpern des Isotyps IgG2a, die mit dem Komplementsystem interagieren können.

Der Rezeptor für  $\text{IFN}\gamma$  besteht aus den zwei Untereinheiten  $\text{IFN}\gamma\text{-R1}$  und  $\text{IFN}\gamma\text{-R2}$  (32-34). Die beiden Ketten sind auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert und ihre Expression wird unabhängig voneinander reguliert, wobei die  $\text{IFN}\gamma\text{-R1}$  Kette normalerweise im Überschuss vorliegt und die  $\text{IFN}\gamma\text{-R2}$  Kette der limitierende Faktor ist. Während die Bindung des nicht kovalent gebundenen  $\text{IFN}\gamma$ -Homodimers hauptsächlich an die  $\text{IFN}\gamma\text{-R1}$  Untereinheit erfolgt, so ist die  $\text{IFN}\gamma\text{-R2}$  Kette für die Signaltransduktion ins Zellinnere unabdingbar (35, 36) (37). Die Bindung von  $\text{IFN}\gamma$  an den Rezeptor führt zur Bildung eines Multirezeptorkomplex aus je zwei  $\text{IFN}\gamma\text{-R1}$ - und  $\text{IFN}\gamma\text{-R2}$  -Ketten und in Folge zur Aktivierung einer JAK-STAT – Signalkaskade (35, 38). Die dadurch gebildeten STAT1 Homodimere können in den Zellkern eindringen und dort an ein Konsensusmotiv der DNA binden, das sich in den regulatorischen Elementen vieler  $\text{IFN}\gamma$ -induzierbarer Gene findet (*gamma-activated site* = GAS) (30, 39, 40). Abb. 1.1 zeigt ein Modell des  $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptors, Abb. 1.2 zeigt schematisch das Zusammenspiel von IL-12 und  $\text{IFN}\gamma$  in der zellulären Immunabwehr.

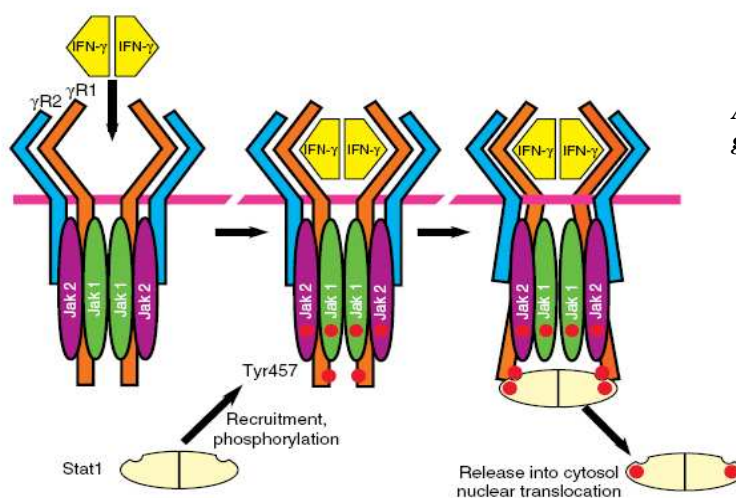


Abb.1.1: Modell des Interferon gamma Rezeptors (2)

Im Gegensatz zum IL-12 Rezeptor wird der IFN $\gamma$  Rezeptor auf den meisten kernhaltigen Zellen exprimiert, wodurch sich für IFN $\gamma$  ein breites Wirkungsspektrum ergibt (41). IFN $\gamma$  ist ein starker Aktivator von Makrophagen, weshalb es früher auch als *macrophage activating factor* bezeichnet wurde. In den Makrophagen induziert IFN $\gamma$  die Stickoxidproduktion und fördert so die Zytotoxizität dieser Zellen (42). Wie bereits erwähnt, ist IFN $\gamma$  ein wichtiger Faktor zur Differenzierung von TH1 Zellen, indem es vor allem die Produktion von IL-12 und die Expression des IL-12 Rezeptors fördert (43). IL-12 und IFN $\gamma$  verstärken sich also gegenseitig in ihrer Expression und bilden so die Komponenten eines positiven Rückkopplungsmechanismus, mit dem die TH1-Immunantwort aufrechterhalten wird (29, 43). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Rezeptorkette IFN $\gamma$ -R2 von reifen TH1-Zellen nicht mehr exprimiert wird und diese Zellen somit unempfindlich werden für IFN $\gamma$ . Dieses dient möglicherweise als Mechanismus um die TH1 Immunantwort eindämmen zu können (39, 44).

Neben der Entwicklung von TH1-Zellen wirkt IFN $\gamma$  auch auf die Entwicklung und Aktivität von zytotoxischen T-Zellen (26).

In B-Zellen fördert IFN $\gamma$  einen Isotypenwechsel der Immunglobuline hin zu IgG2a, welches daher mit einer TH1 Immunantwort assoziiert ist.

IFN $\gamma$  verstärkt zudem die Expression von MHC Klasse I und Klasse II Molekülen. MHC Klasse I Moleküle dienen der Präsentation von intrazellulären Peptiden und werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Dringt ein Virus oder ein anderer Erreger in eine Zelle ein, so werden Proteine der Stoffwechselprodukte im Proteasom der Zelle abgebaut und an MHC Klasse I Moleküle gebunden auf der Oberfläche der Zelle präsentiert. Zytotoxische T-Zellen können diese Peptide als körperfremd erkennen und die befallene Zelle zerstören. IFN $\gamma$  erhöht die Zahl der MHC Klasse I Moleküle auf der Oberfläche und reguliert verschiedene Komponenten des Proteasoms, wodurch die Diversität der präsentierten Moleküle erhöht wird (45-48). Diese Veränderungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass eine befallene Zelle schneller von zytotoxischen T-Zellen erkannt wird. MHC Klasse II Moleküle werden auf Antigenpräsentierenden Zellen wie DC, Makrophagen und auch B-Zellen exprimiert und dienen der Präsentation von extrazellulären Peptiden für die T-Helferzellen. Die Expression von MHC Klasse II Molekülen wird ebenfalls durch IFN $\gamma$  erhöht (42).

In vaskulären Endothelzellen fördert IFN $\gamma$  die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, MAdCAM oder ICAM. Diese Moleküle dienen T- Lymphozyten als Interaktionspartner, wenn sie aus den Blutgefäßen in das Gewebe zum Entzündungsherd vordringen müssen (49).

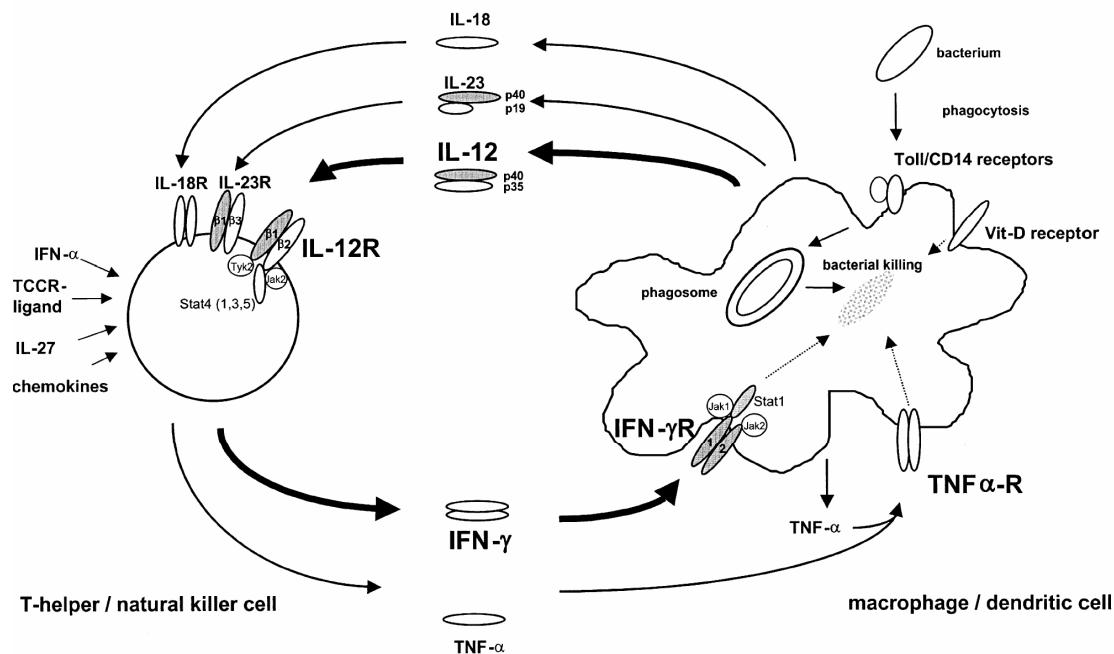


Abb. 1.2: IL-12 und IFN $\gamma$  in der zellulären Immunabwehr (6)

### 1.2.3 Die IL-12 Zytokinfamilie

Neben IL-12, das lange Zeit das einzige bekannte heterodimere Interleukin war, sind mittlerweile zwei weitere heterodimere Interleukinmoleküle nämlich Interleukin-23 (IL-23) und Interleukin-27 (IL-27) identifiziert worden. Beide weisen Homologien zu IL-12 auf.

IL-23 setzt sich aus der p40 Untereinheit, die auch die Untereinheit für IL-12 darstellt und einer p19 Untereinheit zusammen (50). Der Rezeptor besteht aus der IL-12R $\beta$ 1 Kette und der sogenannten IL-23R Kette (51). IL-23 besitzt sowohl ähnliche als auch unterschiedliche Funktionen wie IL-12. Es wird hauptsächlich von aktivierten DCs sezerniert und ist im Gegensatz zu IL-12 nicht in der Lage die Proliferation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren. Dagegen kann IL-23 in Gedächtnis-T-Zellen die IFN $\gamma$  Produktion induzieren, was für IL-12 nicht gezeigt werden konnte. Eine wichtige Funktion von IL-23 ist die Induktion der Interleukin-17 (IL-17) Produktion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen (52), ein Molekül das mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert ist (53).

Das dritte bislang identifizierte Mitglied der IL-12 Zytokinfamilie ist Interleukin-27 (IL-27), das sich aus den Untereinheiten EBL3 und p28 zusammensetzt (54). EBL3 weist Homologien zu p40 auf, p28 dagegen besitzt Ähnlichkeit mit p35.

Der Rezeptor für IL-27 ( TCCR/WSX-1) wird auf naiven CD4 T-Zellen und NK Zellen exprimiert. Wie beim IL-12 Rezeptor verläuft die Signaltransduktion über den JAK-STAT Signalweg, wobei im Falle von IL-27 hauptsächlich STAT1, STAT3, und STAT5 phosphoryliert werden. STAT4 wird dagegen nur zu einem geringen Anteil aktiviert (55). IL-27 induziert die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und kann somit unabhängig von IFN- $\gamma$  die Expression der IL-12-R $\beta$ 2 Kette fördern. IL-27 ist allerdings alleine nicht ausreichend die Entwicklung von IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen zu induzieren(55).

Die Entdeckung dieser Zytokine mit überlappenden Funktionen führt dazu, dass viele Effekte, die bisher auf ein Fehlen von IL-12 zurückgeführt wurden, neu untersucht werden müssen.

Alle drei Zytokine sind an der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu TH1-Zellen beteiligt, für die zeitliche Abfolge in der die Zytokine IL-12, IL-23 und IL-27 in diesen Prozess involviert sind, gibt es allerdings bislang nur Theorien (56).

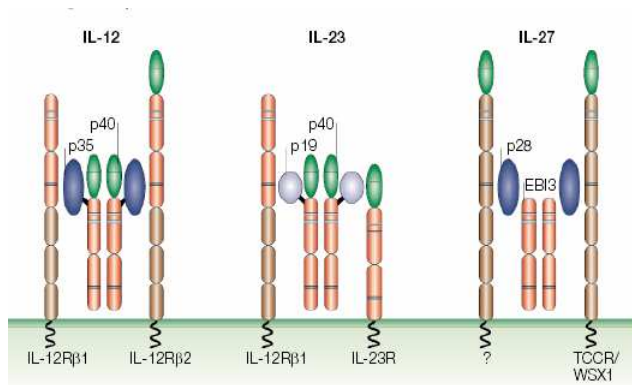


Abb. 1.3 Die IL-12 Zytokin-Familie (4)

#### 1.2.4 Phänotyp der konventionellen Knockouts für die IL-12-Untereinheiten p40 (p40<sup>-/-</sup>) und p35 (p35<sup>-/-</sup>)

Für beide IL-12 Untereinheiten wurden Knockout-Mäuse generiert und analysiert (57, 58). Die Mäuse beider Linien entwickeln sich normal und zeigen keine Veränderungen in der Organentwicklung, Hämatopoiese oder bezüglich der Fertilität. Mäuse mit Mutationen im IL-12-Gen sind jedoch anfällig für intrazelluläre Pathogene wie *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* (59), *Leishmania major* (60) und verschiedene Mycobakterien, darunter auch normalerweise apathogene Stämme (61).

Es bestätigte sich, dass IL-12 für die Produktion von IFN- $\gamma$  als Reaktion auf eingedrungene Pathogene eine sehr wichtige Rolle spielt, allerdings wird IFN- $\gamma$  zu einem geringen Anteil IL-12 unabhängig produziert (57, 58). Die Behandlung von IL-12 p40<sup>-/-</sup> Mäusen mit rekombinantem IL-12 (rIL-12) konnte die TH1 Immunantwort nicht vollständig wiederherstellen, was beweist, dass für eine TH1 Immunantwort sowohl IFN- $\gamma$  als auch IL-12 benötigt werden (57). Entgegen der Erwartung zeigen sich Unterschiede zwischen p35<sup>-/-</sup> Mäusen und p40<sup>-/-</sup> Mäusen in verschiedenen Infektionsexperimenten. Die p35<sup>-/-</sup> Tiere sind oft weniger anfällig für Erreger oder weisen einen leichteren Krankheitsverlauf auf. Es wurde daher spekuliert, ob die p40 Homodimere, die in den p35<sup>-/-</sup> Mäusen gebildet werden können, in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen (62). Doch die Entdeckung von IL-23, einem Interleukin, das sich aus der p40 Untereinheit und einer p19 Untereinheit zusammensetzt, zeigte, dass es sich bei der Inaktivierung von p40 um einen Knockout für zwei Interleukine handelt. Da IL-12 und IL-23 teilweise überlappende Funktionen haben, ist es wahrscheinlich, dass die Unterschiede zwischen der p35<sup>-/-</sup> Maus und der p40<sup>-/-</sup> Maus auf dem Fehlen von IL-23 in der letzteren beruht und weniger auf dem Fehlen von p40 Homodimeren (63). Die biologische Relevanz der Homodimere bleibt jedoch umstritten und darf bei einer späteren Analyse der Mäuse mit konditioneller Inaktivierung des p40 Gens nicht außer Acht gelassen werden.

#### 1.2.5 Phänotyp der konventionellen Knockouts für den IFN $\gamma$ -Rezeptor (*Ifngr1*<sup>-/-</sup> und *Ifngr2*<sup>-/-</sup>)

Für beide IFN $\gamma$  Rezeptorketten wurden Knockout-Mäuse erzeugt (64, 65). Die Tiere dieser Mauslinien zeigen keine phänotypischen Anomalien, entwickeln sich normal und sind fertil. Auch die Entwicklung von Leukozyten ist unverändert.



Beide *knockouts* führen jedoch zu Defekten in der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen wie *Listeria monocytogenes*, *Leishmania major*, Mycobakterien und bestimmten Viren (66). Viele der beobachteten Effekte lassen sich auf eine unzureichende Aktivierung von Makrophagen (42) und einen Defekt in der TH1-Immunantwort zurückführen. Die Auswirkungen der Mutationen im IFN $\gamma$  Rezeptor auf die TH1-Immunantwort wurde von mehreren Arbeitsgruppen in verschiedenen Infektionsmodellen untersucht, was zu unterschiedlichen Ergebnissen führte. Zusammenfassend kann man sagen, dass IFN- $\gamma$  eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer TH1 Immunantwort und in der Balance zwischen TH1 und TH2 Immunantwort spielt, die Effekte von IFN $\gamma$  in Infektionsversuchen und Modellen für Autoimmunerkrankungen jedoch sehr variabel sein können.

### 1.2.6 Serum Response Factor (SRF)

Der *serum response factor* (SRF) ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der an Prozessen der Zellproliferation und Differenzierung beteiligt ist. SRF gehört zur Gruppe der MADS-box Transkriptionsfaktoren. Der Name leitet sich von den Mitgliedern dieser Gruppe ab (MCM-1, Agamous, Deficiens, SRF) wobei Deficiens und Agamous aus Pflanzen stammen, MCM-1 dagegen aus der Hefe (67).

Die MADS-box Transkriptionsfaktoren besitzen alle eine basische DNA Bindungsdomäne, eine Dimerisierungsdomäne und einen Bereich für Protein-Protein-Interaktionen. Am carboxyterminalen Ende von SRF befindet sich eine Transaktivierungsdomäne mit mehreren Phosphorylierungsstellen.

SRF ist evolutionär stark konserviert, so dass zwischen der Form im Menschen und der Form in *Drosophila* eine 93%ige Homologie besteht (68, 69). Von SRF wurden in der Maus vier Isoformen, die durch alternatives Spleißen gebildet werden, identifiziert. Diese werden teilweise gewebespezifisch exprimiert und die Spleißvariante SRF-I stellt eine dominant-negative Form des Moleküls dar (70).

SRF bindet als Dimer an das *serum response element* (SRE), eine spezifische Basenabfolge auf der DNA, die die sog. CArG-box und eine spezifische Sequenz für die Interaktion mit Kofaktoren von SRF enthält (71, 72) (s. Abb. 1.4). Die SRF-abhängige Transkription lässt sich durch verschiedene extrazelluläre Stimulanzen anregen, dazu gehören neben Serum und verschiedenen mitogenen Wachstumsfaktoren auch Lipopolysaccharid, (LPS), *lysophosphatidic acid* (LPA), Tumor Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Chemikalien, die einen Ca<sup>2+</sup> Anstieg im Zytoplasma auslösen und UV-Licht.

Die Aktivität von SRF wird durch mehrere Mechanismen beeinflusst: durch Phosphorylierung, vor allem am Serin 103, was eine verstärkte Bindung an die DNA zur Folge hat (73), die Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren (70, 74, alternatives Splicing {Kemp, 2000 #477, 75) und Regulation der Kerntranslokation (76).

Die Interaktion von SRF mit Kofaktoren ist maßgeblich an der Regulierung der SRF Aktivität beteiligt. Es gibt dabei zwei wichtige Gruppen an Kofaktoren. Die sog. *ternary complex factors* (TCF), eine Untergruppe der Familie der ets-Domänen Proteine (77, 78) und die Myocardin-verwandten Kofaktoren. Während die Myocardin-verwandten Kofaktoren nur mit SRF interagieren, binden die TCFs zusätzlich an spezifische Erkennungssequenzen der DNA, was zur Vergrößerung der regulatorischen DNA-Sequenz führt. Von den TCFs sind bisher die drei Mitglieder Elk-1, Sap1a und Net/ Sap2 beschrieben worden, die alle über vier ähnliche Proteindomänen (A-D) verfügen. Die Ets-Domäne ist die DNA Bindungsdomäne und wird auch A-box genannt. Sie ist bei der Gruppe der TCFs typischerweise am N-Terminus lokalisiert und interagiert mit einem bestimmten Sequenzmotiv der DNA. Die B-Domäne interagiert mit SRF und vermittelt die Bildung des *ternary complex*. Die Aktivierungs- oder C-Domäne wird durch sog. MAP Kinasen (*mitogen activated protein kinases*) phosphoryliert und die D-Domäne ist wichtig für die Interaktion mit den MAP Kinasen. Neben diesen gemeinsamen Domänen verfügt jeder TCF über weitere Domänen, die eine regulative Rolle bei Aktivierung, Inhibierung sowie Kernimport und -export der TCFs spielen (3). Von allen TCFs gibt es Isoformen, die durch alternatives Spleißen oder interne Translationsstartsequenzen gebildet werden und einen kompetitiven inhibitorischen Effekt haben können (3, 79, 80). Abb. 1.4 zeigt schematisch die Bildung eines TCFs.

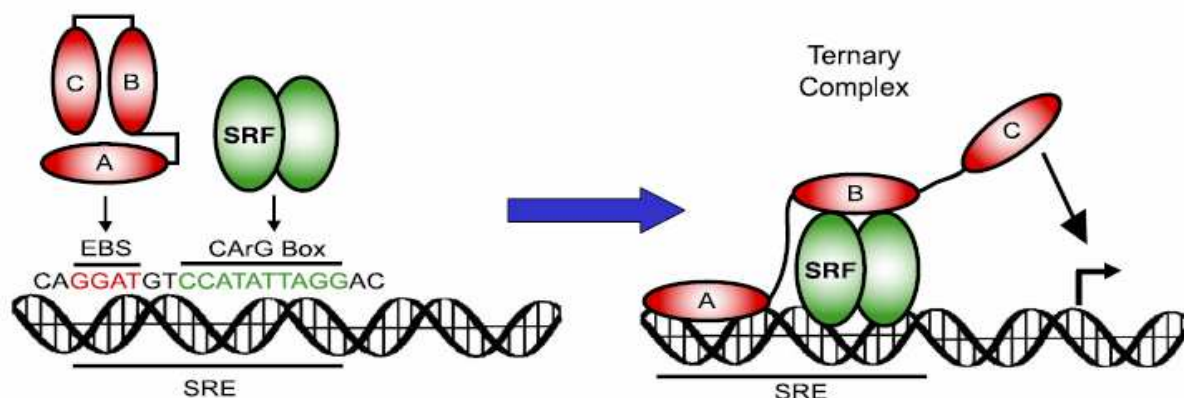


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Bildung eines ternary complex aus SRF und einem ternary complex factor (3)

Die Aktivität der Kofaktoren bildet einen wichtigen Mechanismus zur Regulation von SRF. Die TCFs verfügen über einen autoinhibitorischen Mechanismus, der die Bindung an die DNA im inaktiven Zustand verhindert. Dabei kommt es zur intramolekularen Interaktion zweier Domänen, so dass z.B. die Bindung des TCFs an die DNA unterbunden wird. Durch Phosphorylierung des TCFs wird eine Konformationsänderung bewirkt wodurch die Domäne zur Bindung an die DNA frei wird. Solche Mechanismen konnten für verschiedene TCFs nachgewiesen werden (81). Daneben gibt es inhibitorische Moleküle, die durch Interaktion mit den TCFs deren DNA-Interaktion unterbinden können und so Einfluss auf die Aktivität des *ternary complex* nehmen (82).

Die Phosphorylierung und damit Aktivierung der TCFs erfolgt wie bereits erwähnt über die MAP Kinasen. Es sind bislang vier MAP Kinasen Signalwege beschrieben worden, die durch verschiedene Signale induziert werden und auf die TCFs unterschiedlich reagieren. Elk-1 lässt sich aktivieren über die ERK-, JNK- und p38 Kaskade, Net wird über die ERK und JNK Kaskade und Sap-1 über ERK und p38 aktiviert (83).

Alle Signalkaskaden werden ihrerseits durch verschiedene extrazelluläre Signale ausgelöst. Damit wird deutlich, wie so verschiedene Stimuli wie Mitogene, Serum, UV-Licht usw. die SRF-abhängige Transkription der IEGs auslösen können.

Die zweite Gruppe der SRF-Kofaktoren besteht aus der Familie Myocardin/ MKL Proteine mit den Mitgliedern Myocardin, MKL1 (MAL) und MKL2. Diese Proteine interagieren mit der selben SRF-Region wie die TCFs, so dass die verschiedenen Kofaktoren miteinander um die Bindung an SRF konkurrieren. Im Gegensatz zu den TCFs besitzen Myocardin und die MKL-Proteine jedoch keine DNA-Bindungsdomänen.

Die Aktivierung von SRF durch diese Kofaktoren verläuft in Abhängigkeit von RhoA, einem Mitglied der Familie kleiner GTPasen. (84). RhoA fördert die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin und die Aktivität von SRF hängt direkt vom G-Aktingehalt der Zelle ab, wobei die SRF-Aktivität zunimmt, wenn der G-Aktingehalt durch Assemblierung zu F-Aktin abnimmt (85, 86). Der SRF-Kofaktor MKL1 (auch als MAL bezeichnet) ist an der SRF abhängigen Expression verschiedener Gene unter anderem von SRF selbst beteiligt. MAL liegt im inaktiven Zustand an G-Aktin gebunden im Zytoplasma vor. Eine Stimulierung der Zellen mit Serum führt in Abhängigkeit von RhoA zu einer Akkumulation von MAL im Zellkern. Dabei wird MAL durch die Aktinpolymerisation von G-Aktin freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo es mit SRF interagiert und die Transkription verschiedener Zielgene initiiert. Zu den Genen, die über diesen Mechanismus reguliert werden, gehören z. B. *Srf* selbst, *β-aktin*, *vinculin* sowie verschiedene muskelspezifische Gene (87).

Eine dritte Möglichkeit SRF zu aktivieren, liegt in einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration. Dieses kann z.B. zu einer SRF abhängigen Transkription von *c-fos* führen. SRF wird dabei möglicherweise über Calmodulin-Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert (88, 89).

SRF fungiert als Transkriptionsfaktor verschiedener Gene, entdeckt wurde es aber ursprünglich durch seine Interaktion mit dem *c-fos* Promotor und der daraus resultierenden proliferationsfördernden Wirkung auf Zellen (71). Die Expression von *c-fos* ist notwendig, damit eine Zelle aus dem ruhenden Zustand der G0 Phase wieder in die G1 Phase und damit in die Mitose eintreten kann. *c-fos* gehört zu den sog. *immediate early genes* (IEG). Deren Transkription wird nach Interaktion mit Wachstumsfaktoren in einer Zelle innerhalb von Minuten induziert, ohne dass dazu eine Neusynthese von Protein nötig ist. Weitere durch SRF induzierbare IEGs sind z.B. *fosB*, *junB*, *egr-1* und *srf* selbst (90).

Neben seiner Funktion in der Zellproliferation spielt SRF in der Herzentwicklung (91) und in der Differenzierung von Muskelzellen (92) und Neuronen (93) eine essentielle Rolle. Viele muskelspezifische Gene enthalten eine oder mehrere CArG-boxen im Promotor und werden durch SRF reguliert (94) wie z.B. Glattmuskel- $\alpha$ -Aktin, kardiales- $\alpha$ -Aktin und Skelettmuskel- $\alpha$ -Aktin.

Aus Zellkulturstudien sind verschiedene Funktionen von SRF oder seinen Kofaktoren im hämatopoietischen System bekannt, so kann SRF z.T. über Lymphozyten-spezifische Signalwege aktiviert werden und ist direkt an der transkriptionellen Kontrolle von Genen der Immunzellen wie z.B. IL-2R $\alpha$  beteiligt (95).

Die Aktivierung des B- und des T-Zellrezeptors (BCR und TCR) führt zur SRF abhängigen Transkription von IEGs wie *c-fos* oder *egr-1* (96-98). Außerdem kann SRF durch die Signale von Zytokinen wie z.B. G-CSF (*granulocyte colony-stimulating-factor*) aktiviert werden (99).

Die Inaktivierung von verschiedenen SRF-Kofaktoren, Zielgenen von SRF oder an der SRF-Signaltransduktion beteiligter Proteine führt zu verschiedenen Defekten im Immunsystem.

Wird z. B. der SRF-Kofaktor Sap1 in Mäusen inaktiviert, führt das zur Reduktion der CD4<sup>+</sup> Zellen im Thymus (100).

Vav ist ein Mitglied der Familie der Vav *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) für GTPasen der Rho Familie. Es ist in die Signaltransduktion involviert, die über die Aktivierung des TCR zu einer SRF-abhängigen Transkription verschiedener Gene führt. Der

Knockout dieses Gens zeigt vielfältige Defekte in der Entwicklung von B- und T-Zellen (98, 101, 102).

Neben der Funktion als Regulator der Zellproliferation ist SRF auch an der Expression antiapoptotischer Gene beteiligt und damit wichtig für das Überleben von Zellen. Die Inaktivierung verschiedener SRF abhängiger antiapoptotischer Gene führt ebenfalls zu Defekten in der Entwicklung von Lymphozyten. Bcl-2 und Mcl-1 sind Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, welche die Aktivität von Caspasen inhibieren und daher zu den antiapoptotischen Genen gehören. Bcl-2 und Mcl-1 sind direkte Zielgene von SRF und ihre Inaktivierung hat zahlreiche Effekte auf die Entwicklung und/ oder das Überleben von Lymphozyten zur Folge (103-105).

### 1.2.7 Phänotyp des konventionellen Knockouts für *Srf*

Um die Funktion von SRF im lebenden Organismus zu erforschen, wurden Knockout-Mäuse für das SRF Gen erzeugt. Das Konstrukt führt nach homologer Rekombination in das ES-Zellgenom zu einem Verlust des ersten Exons, das die DNA-Bindungsdomäne und die Dimerisierungsdomäne kodiert, so dass ein eventuell resultierendes Protein nicht mehr funktionell ist (106).

Die Embryonen, in denen beide *Srf*-Allele deletiert sind, entwickeln sich bis zum Embryonal-Stadium 6.5 normal. Im frühen Embryonal-Stadium 7.5 weisen die *Srf*<sup>-/-</sup> Embryos eine reduzierte Größe und morphologische Abnormalitäten auf. Die *Srf*<sup>-/-</sup> Embryos zeigen zudem einen Defekt in der Gastrulation und sind nicht in der Lage Mesoderm zu bilden. Diese Embryos sterben daher ab, so dass sich nach Tag 12.5 keine *Srf*<sup>-/-</sup> Embryos mehr nachweisen lassen. Diese Beobachtungen zeigen, dass SRF essentiell für die Bildung des Mesoderms und damit lebenswichtig für den Embryo ist. Da die Embryos sich bis Tag 6.5 normal entwickeln können, ist damit gezeigt, dass SRF nicht unabdingbar für die Zellteilung ist (106).

In den *Srf*<sup>-/-</sup> Embryos ist die Expression der Gene *c-fos* und *egr-1* zwar stark reduziert, aber zu einem geringen Level vorhanden, was die Vermutung nahe legt, dass eine basale Expression dieser Gene unabhängig von SRF reguliert wird. Dagegen konnte in den *Srf*<sup>-/-</sup> Embryonen keine Expression von  $\alpha$ -Aktin Genen festgestellt werden, während Transkripte dieser Gene in Wildtyp- und heterozygoten Embryos ab Tag 7.5 nachgewiesen werden können.

Die Analyse von *Srf*<sup>-/-</sup> ES-Zellen bestätigt, dass das Fehlen von SRF die Proliferationsrate der Zellen nicht beeinträchtigt (107, 108). *Srf*<sup>-/-</sup> ES-Zellkolonien zeigen im Vergleich zu Kontrollzellen morphologische Unterschiede besonders in der Interaktion mit dem Substrat

und in Zell-Zell-Interaktionen, was wahrscheinlich mit der gleichzeitig beobachteten Reduktion der Aktin- und Vinculin-Expression zusammenhängt (108).

Für weitergehende Analysen der Funktion von SRF *in vivo* war es aufgrund des letalen Effektes des vollständigen Knockouts sinnvoll eine Maus mit einem konditionalen Knockout zu erzeugen und *Srf* durch Kreuzung dieser Maus mit verschiedenen Cre-Mäusen zelltypspezifisch auszuschalten. Die *Srf-flex1neo* Maus enthält funktionelle *Srf*-Allele, in denen das erste Exon von zwei loxP Sequenzen flankiert ist. Außerdem enthält die Maus noch eine Neokassette, da sich aus den Neo-deletierten ES-Zellklonen zunächst keine Keimbahntransmission des mutierten Gens ergab (5) (s. Abb. 3.13).

Um die Funktion von SRF in B-Zellen zu analysieren, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit *Srf-flex1neo*-Mäuse mit CD19-Cre-Mäusen verpaart und die Auswirkungen des Verlusts von SRF in B-Zellen untersucht werden.

### 1.2.8 Konditionale Mutagenese der Maus

Die konditionale Mutagenese ermöglicht es, Gene zelltypspezifisch oder zu einem bestimmten Zeitpunkt auszuschalten und so die Auswirkungen des Genverlusts in einem Zelltyp oder in einem Entwicklungsstadium auf den Gesamtorganismus zu beobachten. Für diese Form der Mutagenese werden das sogenannte Cre-loxP System und das Flp-FRT-System verwendet.

Die Cre-Rekombinase (*causes recombination of the bacteriophage P1 genome*) wurde ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 isoliert. Sie vermittelt die Rekombination zwischen zwei sog. loxP Sequenzen (*locus of crossing over(=x) in P1*)(109). Die loxP-Sequenz ist ein imperfektes Palindrom mit 13 bp in direkter Sequenzwiederholung (sog. *inverted repeats*), die durch eine 8 bp lange nicht palindrome Sequenz getrennt werden (sog. *spacer*) (110). Durch die nicht palindrome Sequenz sind loxP Sequenzen gerichtet, so dass zwei unterschiedliche Orientierungen von loxP Sequenzen unterschieden werden können. Das System, dass bei der Replikation des P1 Genoms der Teilung des duplizierten Genoms in zwei identische Teile dient, funktioniert ebenfalls sehr effizient in eukaryotischen Zellen (70, 111, 112). Es lässt sich verwenden, um loxP flankierte Gene oder Genabschnitte zu deletieren (113), wenn die loxP Sequenzen die gleiche Orientierung besitzen oder zu invertieren, wenn die loxP Sequenzen gegensätzlich orientiert sind (s. Abb. 1.5).

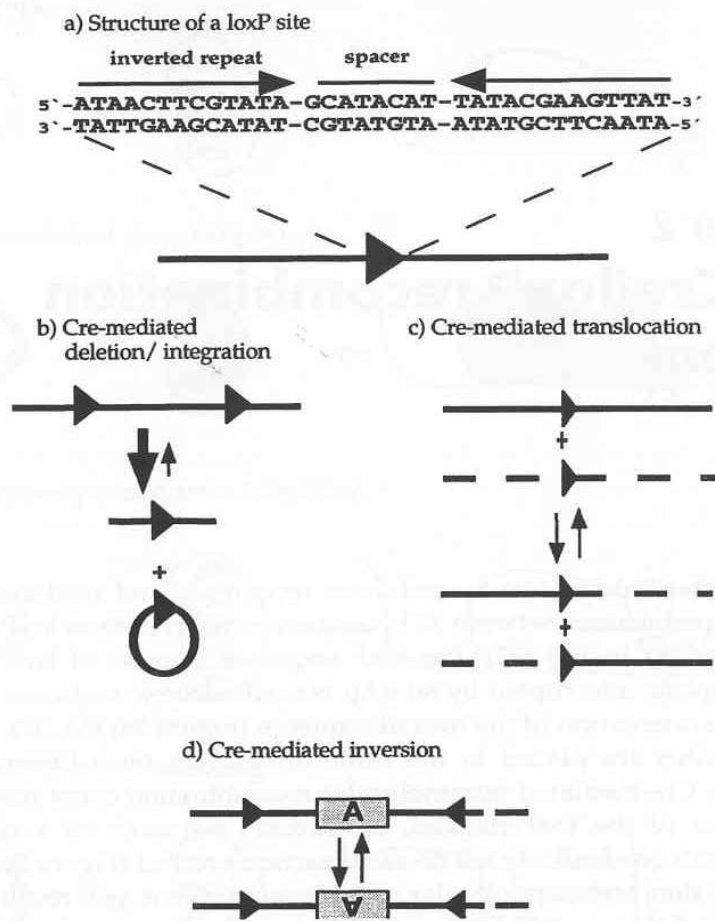


Abb.1.5 : loxP Sequenz und Verwendungsmöglichkeiten (1)

Typische Vektoren zur konditionalen Mutagenese enthalten einen Teil des Zielgens flankiert von loxP Sequenzen, als Selektionsmarker das Neomycin-Gen, das die Selektion in Bakterien und ES-Zellen ermöglicht und eine dritte loxP Sequenz oder zwei FRT Sequenzen (s.u.), die zur Deletion der Selektionskassette nach der Identifizierung von ES-Zellen mit homologer Rekombination dienen. Die Deletion des Selektionsmarkers erfolgt bei Verwendung von drei loxP Sequenzen durch die Cre-Rekombinase und hat daher den Nachteil, dass bei diesem Schritt nicht nur der Selektionsmarker deletiert werden kann, sondern auch der gefloxt Genabschnitt. Die Identifizierung von Klonen mit korrekter Deletion der Selektionskassette erfordert deshalb in diesem Fall einen hohen Zeitaufwand. Die Verwendung der Flp-Rekombinase und deren spezifischen Erkennungssequenzen (FRT-Sequenzen (*Flp recognition targets*)) ermöglicht es die beiden Deletionsereignisse unabhängig voneinander zu induzieren (114). Die Rekombinase Flp und die dazugehörigen Erkennungssequenzen FRT wurden aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (115, 116). Die FRT Sequenzen bestehen wie

die loxP Sequenzen aus zwei 13 bp langen *inverted repeats* getrennt durch einen 8 bp langen *spacer*. Daher sind auch die FRT Sequenzen gerichtet und besitzen zwei mögliche Orientierungen.

Da es bereits verschiedene transgene Mäuse für die Expression der Cre-Rekombinase gibt (sog. Cre –Zoo; s. Abb. 1.6), wird das Cre-loxP System meistens zur Deletion des Gens verwendet, das Flp-FRT System hingegen zur Deletion des Selektionsmarkers. Zudem ist die Effizienz des ursprünglichen Flp-FRT Systems geringer als die des Cre-loxP Systems, was z.T. daran liegt, dass die Flp-vermittelte Rekombination ein Temperaturoptimum von 30°C hat, Säugerzellen aber bei 37°C kultiviert werden (117, 118). Mittlerweile gibt es jedoch die sog. Flpe-Rekombinase, die eine verbesserte Effektivität bei 37°C aufweist und eine vergleichbare Rekombinations-Effizienz wie das Cre-loxP System besitzt (119, 120). Für die Rekombination gefloxter DNA-Abschnitte gibt es zahlreiche Mauslinien, welche die Cre-Rekombinase unter zelltypspezifischen oder induzierbaren Promotoren exprimieren. Die MxCre-Maus ist ein Beispiel für eine induzierbare Cre-Expression (121). Durch Injektion von Interferon  $\alpha$  wird die Cre-Expression in allen Zellen induziert und der gefloxt DNA-Abschnitt deletiert. Dies ermöglicht es die Funktion eines Gens zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit werden CD19-Cre Mäuse verwendet, die die Cre-Rekombinase unter dem B-zell-spezifischen Promotor des CD19 Gens exprimieren. Dadurch wird das SRF-Gen spezifisch in B-Zellen mit Beginn der CD19-Expression im prä-B-Zell-Stadium deletiert (122). Da es sich bei dieser Maus um einen sog. *knock in* handelt, bei der das Cre-Gen an die Stelle eines CD19-Allels integriert wurde, sind die CD19-Cre Mäuse gleichzeitig hemizygot für das CD19-Gen.

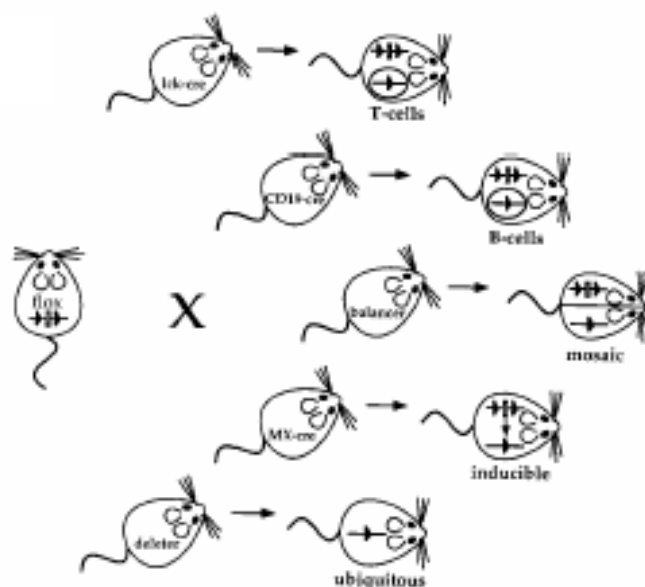


Abb.1.6 : Der Cre-Zoo



### 1.2.9 Herstellung von Targeting Vektoren unter Verwendung der Technik des ET Klonierens

Das klassische Klonieren von DNA, also das künstliche Zusammenfügen von DNA-Fragmenten, ist abhängig von dem Vorhandensein von Restriktionsschnittstellen, mit denen sich passende (oder gerade) DNA-Enden für die anschließende Ligation mit einem Insert erzeugen lassen. Die Möglichkeiten Veränderungen in bestimmten Abschnitten einer DNA vorzunehmen, sind damit begrenzt. Besonders bei der Erzeugung von Konstrukten für Knockouts und konditionale Knockouts in Mäusen kann die Verfügbarkeit von Restriktionsschnittstellen ein limitierender Faktor sein, der zu Kompromissen im Aufbau eines *targeting*-Konstruktes zwingt.

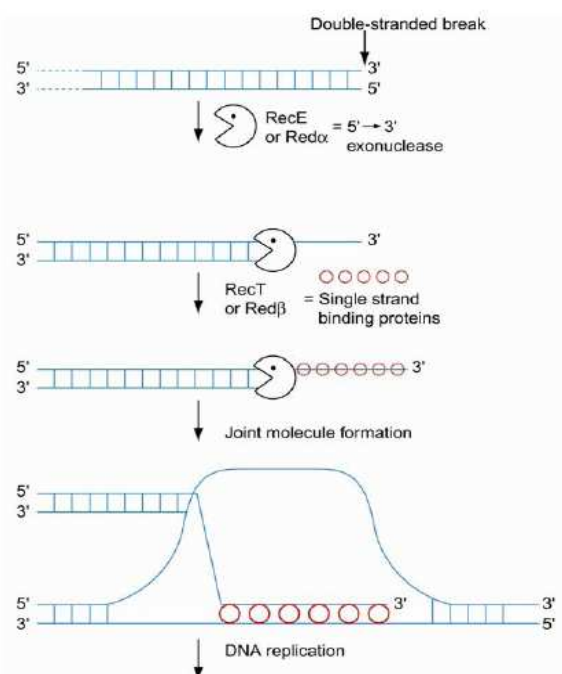
Das auch als *Recombineering* bezeichnete ET Klonieren ist eine relativ neue Technik, mit der sich in *E. coli* DNA *in vivo* gezielt mutieren lässt (123). Sie beruht auf homologer Rekombination von DNA mit gleichen Sequenzen und wird durch die Enzyme RecE und RecT vermittelt, die ursprünglich aus dem  $\lambda$ -Phagen stammen (124-126). Ein entsprechendes System findet sich auch im  $\lambda$  Phagen und die beiden äquivalenten Enzyme zu RecE und RecT heißen Red $\alpha$  und Red $\beta$ . Dieses System lässt sich ebenfalls zur *in vivo* Mutagenese in *E. coli* einsetzen (127).

Bei RecE und Red $\alpha$  handelt es sich um 5'-3' Exonukleasen (128), RecT und Red $\beta$  dagegen sind DNA-Einzelstrang bindende Proteine, die die Zusammenlagerung von homologen DNA-Strängen, den Transfer von DNA-Strängen und Stranginversion vermitteln können (124, 126). Beide Proteine müssen exprimiert werden um eine Rekombination zu vermitteln. Dabei wird die Rate erhöht, wenn das DNA-bindende Protein im Überschuss vorliegt (129). Der Mechanismus, der der homologen Rekombination zugrunde liegt, ist in Abb. 1.6 dargestellt. Die 5'-3' Exonukleasen RecE bzw. Red $\alpha$  erkennen Doppelstrangbrüche, wie sie bei linearisierter DNA vorliegen, und bauen die DNA-Stränge an den 5' Enden ab. An die so entstehenden Einzelstrang-Überhänge binden RecT bzw. Red $\beta$ , die die Zusammenlagerung von homologen Strängen fördern, was bei der anschließenden Replikation zur homologen Rekombination führt.

Die Fähigkeit der *in vivo* Rekombination lässt sich mit einem Plasmid, dass für die beiden Enzyme RecE und RecT kodiert, in verschiedene *E. coli* Stämme übertragen. Diese kommerziell erhältlichen Plasmide (GeneBridges) enthalten die Information zur Expression der Rekombinationsenzyme unter der Kontrolle eines mit L-Arabinose induzierbaren Promotors. Dadurch lässt sich die Expression der Enzyme zum gewünschten Zeitpunkt

induzieren, so dass es nicht zu ungewollten Rekombinationsereignissen kommt. Zudem verfügen die Plasmide über einen temperatursensitiven Replikationsstartpunkt, so dass sie bei einer Inkubationstemperatur von mehr als 30°C nicht repliziert werden und so bei der Zellteilung ausgedünnt werden. Dadurch gehen die Plasmide schließlich verloren, so dass keine weitere ungewollte Rekombination mehr statt finden kann. Um die Methode in allen gebräuchlichen *E. coli* Stämmen verwenden zu können, enthalten die Plasmide zusätzlich das Red $\gamma$  Gen welches für ein  $\lambda$ -Phagen Protein kodiert, das in der Lage ist, das *E. coli* RecBCD-System zu inaktivieren (130, 131). RecBCD liegt in den meisten *E. coli* Stämmen vor und dient unter anderem zur Degradierung von linearer DNA. Da für die ET Klonierung meist lineare DNA in Form von PCR- Produkten verwendet wird, muss die Aktivität dieses Enzymkomplexes unterdrückt werden.

Die ET Klonierung kann für verschiedene Anwendungen genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode eingesetzt, um loxP Sequenzen zusammen mit dem Selektionsmarker Neomycin in ein genomisches Genfragment zu integrieren. Dabei wurde in einem Fall ein BAC (*bacterial artificial chromosome*) verwendet, das als Einzelkopie in der Bakterienzelle vorliegt. Im anderen Fall wurde ein aus einem BAC auf herkömmliche Weise in einen Klonierungsvektor subkloniertes Gen-Fragment verwendet. Aufgrund des in dem Plasmid enthaltenen Replikationsursprungs können von dem Plasmid mehrere Kopien in einer Bakterienzelle vorliegen. Untersuchungen der Rekombinationshäufigkeit mit homologen DNA-Fragmenten von unterschiedlicher Länge ergaben, dass gute Rekombinationsraten bei einer Homologie von ca. 100 bp (50 bp an jedem Ende des zu rekombinierenden Fragments) zwischen den beiden DNA-Fragmenten erreicht wurden (132).



**Abb.1.6 : Mechanismus der Red/ET Rekombination**  
(Genebridges)

### 1.3 Aufgabenstellung

1.) Mit Hilfe der neuen ET Klonierungsmethode, die im Rahmen dieser Arbeit im Labor etabliert wurde, sollen konditionale *targeting*-Vektoren für die Mutagenese der Gene *IL-12p40* und *Ifngr2* hergestellt werden.

Ausgehend von Sequenzinformationen aus NCBI und ENSEMBL sollen zwei Strategien ausgearbeitet werden, mit denen sowohl die konditionale Inaktivierung des Gens gewährleistet ist als auch ein Nachweis für die erfolgreiche Veränderung der Gene innerhalb der ES-Zellen und der daraus zu erzeugenden Mäuse ermöglicht wird.

2.) Durch Verpaaren der konditionalen Srf- Mausmutante mit der transgenen Maus für die CD19-Cre Rekombinase soll eine B-zell-spezifische Inaktivierung des *Srf*-Gens erreicht werden. Zur phänotypischen Untersuchung dieses Knockouts sollen histologische Analysen, durchflusszytometrische Analysen und Genexpressionsstudien mit Hilfe von RNA-Arrays erfolgen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien allgemein**

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien, Reagenzien und Lösungen werden in Analysequalität verwendet. Bezugsquellen sind Amersham Biosciences, BioRad, Boehringer Ingelheim, Fluka, Höchst, Invitrogen, Merck, Millipore, Promega, Riedel de Haen, Roche, Roth, Sigma. Zur Herstellung von Lösungen wurde Wasser verwendet, das durch ein Milli-Q-System (Millipore) deionisiert wurde.

### **2.2 Material in der Zellkultur**

DMEM, Fötales Kälberserum, 2-Mercaptoethanol (50 mM), Na-Propidium-Iodidruvat (100 mM), nicht essentielle Aminosäuren (100x), PBS, 1x, Streptomycin-/Penicillin-Lösung (je 5 U/μl in 0.85 % Saline), Trypsin-EDTA, 1x: Gibco, Paisley, Schottland

G418, Gelatine, Mineralöl (steril): Sigma, München

LIF: eigene Produktion

DMSO: ICN, Aurora, Ohio

Die Plastikware wie Kulturgefäße und Zentrifugenröhrchen wurde von Corning, Falcon und Nunc bezogen.

### **2.3 Zelllinien**

#### **2.3.1 Murine embryonale Feederzellen mit Neomycinresistenz**

Diese Zellen tragen das Neomycin-Resistenzgen mit SV40 Promotor und wurden aus den Embryonen von Pep IL-4 Mäusen gewonnen (133).

#### **2.3.2 Murine embryonale Stammzellen**

F1 Zellen IDG32: unveröffentlichte F1 Zelllinie. Sogenannte F1 Zellen haben den Vorteil einer erhöhten Keimbahnfähigkeit im Vergleich mit anderen ES-Zelllinien.

## 2.4 Medien für die Zellkultur

### 2.4.1 Medium für murine embryonale Stammzellen

500 ml DMEM (Glutamax, 4500 mg/l Glucose, Propidium-Iodidridoxin ohne Na-Propidium-Iodidruvat) + 75 ml FCS + 6 ml Na-Propidium-Iodidruvat + 6ml Streptomycin/Penicillin + 6ml nicht essentielle Aminosäuren + 120 µl LIF (leukemia inhibitory factor).

Zur Selektion wird dem Medium 0,35 mg/ml G418R zugefügt.

### 2.4.2 Einfriermedium für ES-Zellen

ES-Medium ohne G418 mit 20% DMSO und 50% FCS. Das Medium wird 1:2 verdünnt eingesetzt.

## 2.5 Zellkulturtechniken

### 2.5.1 Auftauen von ES-Zellen

ES-Zellen sollen möglichst zügig aufgetaut werden. Die in Röhrchen eingefrorenen Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit Medium aufgefüllt und bei 250g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird im benötigten Volumen Medium aufgenommen und auf Kulturschalen verteilt.

### 2.5.2 Transfektion von ES-Zellen

Eine 10cm Kulturschale mit ES-Zellen wird mit 2 ml 1x Trypsin/EDTA überschichtet und für ca. 3 min bis zum Ablösen der Zellen in den Inkubator gestellt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 8 ml ES-Zell-Medium abgestoppt, die Zellen mit einer 10 ml Pipette resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 250g werden die Zellen erneut in Medium resuspendiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl wird mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Pro Transfektion werden ca.  $1 \cdot 10^7$  Zellen benötigt. Die Zellen (in 1 ml Medium) werden in einer Küvette mit dem linearisierten Konstrukt (ca. 20µg) gemischt. Die Elektroporation erfolgt bei 240V und 475µF (Gene Pulser, BioRad).

10 min nach der Elektroporation werden die Zellen dann auf 10 Kulturschalen (Ø 10cm), die zuvor mit Feeder Zellen beschickt worden sind, ausgebracht. Es erfolgt ein täglicher Mediumwechsel. Nach 48 Stunden beginnt die Selektion durch Zugabe von G418 in einer

Konzentration von 0,35 mg/ml zum Medium. Nach ca. 7- 10 Tagen können die verbliebenen Klone gepickt werden.

### 2.5.3 Isolierung von ES-Zell Klonen

Durch die Selektion mit G418 im Medium überleben nur ES-Zellen, die das *targeting* - Konstrukt ins Genom integriert haben. Diese Zellen bilden Klone, die ca. 7-10 Tage nach Beginn der Selektion eine hinreichende Größe erreicht haben. Diese Klone werden isoliert und auf drei 96 Loch-Platten verteilt. Zwei dieser Platten dienen der Lagerung der Klone bei – 80°C. Die dritte Platte wird verwendet, um DNA zur Analyse auf homologe Rekombinationsereignisse zu isolieren.

Zur Isolierung der Klone wird eine Kulturschale mit ES-Zellklonen einmal mit PBS gespült und dann mit PBS aufgefüllt, so dass die Zellen bedeckt sind. In eine 96 Loch Platte werden 50µl 1x Trypsin/ EDTA pro Loch vorgelegt. Mit einer gelben Spitze und einer Gilsonpipette (Volumen auf 10µl eingestellt) werden einzelne Zellklone gepickt und in ein Loch mit Trypsin überführt. Die Zellen werden ca. 10 –15 min trypsinisiert.

Die Löcher werden mit 100 µl ES- Medium mit G418 aufgefüllt und die Zellen gut resuspendiert. Danach werden die resuspendierten Zellen auf Löcher von drei verschiedenen 96 Loch Platten mit Feeder Zellen verteilt, so dass drei Duplikate entstehen. Diese Löcher werden ebenfalls mit Medium aufgefüllt so dass pro Loch ein Volumen von 150µl vorliegt. Die Platten werden kultiviert, bis die Zellen sich gut vermehrt haben, aber noch nicht mit der Differenzierung beginnen. Es erfolgt ein täglicher Mediumwechsel mit ES-Medium mit G418. Haben die Zellen auf den Platten zur Lagerung der Klone eine ausreichende Größe erreicht, ohne dass sie mit der Differenzierung begonnen haben, werden die Platten eingefroren (s. 2.5.4: Einfrieren von ES-Zellen).

Die Zellen der dritten Platte werden auf drei neue 96 Loch-Platten gesplittet, die mit Gelatine beschichtet sind. Diese Platten werden inkubiert, bis die Zellen eine maximale Dichte erreicht haben, da für die Southern-Blot Analyse das Differenzierungsstadium der ES-Zellen keine Rolle spielt.

### 2.5.4 Einfrieren von ES-Zellen in 96 Loch Platten zur Lagerung der ES-Zell-Klone

Die 96 Loch Platte mit den ES-Zell-Klonen wird einmal mit PBS gespült und die Zellen mit 50µl 1x Trypsin/EDTA pro Loch für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden sie resuspendiert und jedes Loch mit 200 µl Einfriermedium aufgefüllt. Bei Bedarf können die Löcher noch mit 50 µl Mineralöl überschichtet werden. Die Platte wird mit Parafilm

verschlossen und in Folie gewickelt. Die Platte wird dann in einer Styroporbox bei  $-80^{\circ}\text{C}$  langsam eingefroren und gelagert.

### 2.6 Molekularbiologische Standardmethoden

Die folgenden Methoden werden durchgeführt, wie sie in Molecular Cloning (134) beschrieben sind: Präzipitation von Nukleinsäuren, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Ligation von DNA Fragmenten, Transformation von *E. coli*, photometrische Quantifikation von Nukleinsäuren, Agarose-Gelelektrophorese zur Größentrennung von DNA-Fragmenten und Southern-Blotting.

#### 2.6.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA und BACs erfolgt nach Angaben des Herstellers mit folgenden Isolierungssystemen:

Nucleo Spin Plasmid und Nucleobond AX 500 von Machery-Nagel, Düren.

#### 2.6.2 Restriktionsverdau

Zur Spaltung von Plasmiden, BACs und genomischer DNA aus Schwanzbiopsien oder ES-Zellen werden Restriktionsendonukleasen und enzymespezifische Puffer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Es werden Restriktionsendonukleasen von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) mit den entsprechenden Puffern verwendet.

#### 2.6.3 Isolierung und Spaltung von genomischer DNA aus murinen ES-Zellen in 96 Loch-Platten

Die Zellen werden kultiviert, bis die meisten Löcher konfluent bewachsen sind. Die Zellen werden zweimal mit PBS gespült und können falls nötig trocken bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Zur Isolierung der DNA werden die Zellen zunächst durch einen Verdau mit Proteinase K (Sigma, München) in Tailpuffer nach Laird (135) bei  $54^{\circ}\text{C}$  in einem Schüttelinkubator über Nacht lysiert. Am nächsten Tag erfolgt nach Abkühlung der Platten für 1h bei Raumtemperatur (RT) die Fällung der DNA durch Zugabe von 100% Ethanol (100 $\mu\text{l}$ / Loch). Die Platten werden für mindestens eine Stunde bei RT inkubiert. In dieser Zeit fällt die DNA aus und haftet am Plastik der Kulturschale. Die gefällte DNA wird dreimal mit 70% Ethanol (100 $\mu\text{l}$ / Loch) gewaschen und dann bei RT getrocknet. Die getrocknete DNA wird in 30  $\mu\text{l}$  TE Puffer aufgenommen, über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und am nächsten Tag für den

Restriktionsverdau eingesetzt. Dazu werden pro Loch 5 µl Restriktionspuffer, 0,25 µl RNase A (10 mg/ml; MBI Fermentas) und 2,5 U Restriktionsendonuklease dazu gegeben. Die Spaltung erfolgt über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wird pro Loch 10 µl Auftragspuffer zugesetzt und die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen.

#### 2.6.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von verschiedenen DNA-Präparationen wie PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten aus Restriktionsverdaus erfolgt mit Hilfe des Kits Nucleo Spin Extract (Machery-Nagel). Die zu isolierende DNA wird mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und nach den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

#### 2.6.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

PCRs wurden eingesetzt, um DNA Sonden für Southern-Blot Hybridisierungen herzustellen, zur Genotypisierung von Mäusen und ES-Zell-Klonen und zur Erzeugung von DNA-Fragmenten zur homologen Rekombination durch ET Klonierung. Die Primer werden bezogen von BioSprints. Als Polymerase werden Taq-Polymerase von Roche und selbst hergestellte (*home*) Taq-Polymerase verwendet.

##### 2.6.5.1 PCR zur Genotypisierung von SRF Mutanten und CD19-Cre Mäusen

Zur Genotypisierung der SRF Mutanten und CD19-Cre wurden PCRs eingesetzt (Primer siehe Anhang). Für die PCR mit genomischer DNA wird folgender Reaktionsansatz verwendet: 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl Primer 1 (10 pmol/ µl), 0,5 µl Primer 2 (10 pmol/ µl), 0,25 µl Taq-Polymerase, 5U/ µl ( *home* Taq 1µl), 19,5 µl MilliQ H<sub>2</sub>O, 0,75 µl genomische DNA.

Die Abb. 2.1 verdeutlicht die Strategie zum Nachweis der Srf-Mutanten.

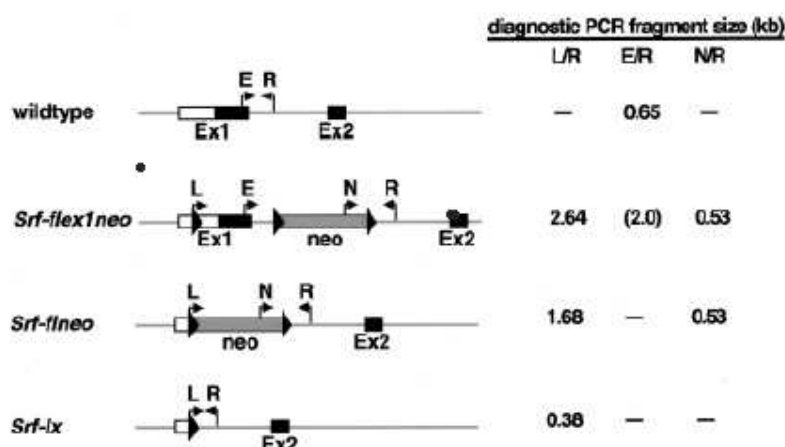


Abb. 2.1: PCR zur Genotypisierung von SRF-Mutanten (5)



### 2.6.6 Southern-Blot und Hybridisierung

Das Blotten von DNA auf eine Membran (Nylon Membran Hybond-N<sup>+</sup>; Amersham Pharmacia Biotech) erfolgt mittels eines alkalischen Kapillarblots (Sambrooks et al.)

### 2.6.7 DNA-Sonden

Als Sonden für die Hybridisierung von Southern-Blots werden PCR Produkte direkt verwendet, oder sie werden in den TA Klonierungsvektor pGEM®- TEasy kloniert und aus diesem über einen Restriktionsverdau isoliert.

### 2.6.8 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Für die radioaktive Markierung werden ca. 50- 100 ng DNA eingesetzt. Die Markierung mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) erfolgt mittels des Ladderman™ Labeling Kits (Takara) und die Aufreinigung der markierten Sonde mittels Zentrifugationssäulchen (ProbeQuant™ G-50 Micro Columns; Amersham Pharmacia Biotech). Von der markierten Sonde (Endvolumen 50  $\mu\text{l}$ ) wird 1  $\mu\text{l}$  im Scintillationsmeßgerät auf die Menge an eingebauter Radioaktivität überprüft. Üblicherweise erhält man Sonden mit einem Wert von 300.000 – 1 000 000 counts/  $\mu\text{l}$ .

### 2.6.9 Hybridisierung und Detektion

Die Southern-Blot Membran wird nach dem Blotten in 0,5 M Tris HCL pH 7,0/ 1,5 M NaCL Puffer neutralisiert, getrocknet und für eine Stunde bei 80°C gebacken. Dadurch wird die Bindung der DNA an die Membran erhöht.

Die Membran wird dann in QuickHyb® Hybridisierungslösung (Stratagene) bei 65°C ca. 30 – 60 min prähybridisiert.

Die Hybridisierung erfolgt nach Zugabe der aufgekochten Sonde indem selben Puffer für mindestens eine Stunde oder über Nacht. Nach der Hybridisierung wird der Blot in 2xSSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur und anschließend in 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 65°C für jeweils 15 min gewaschen. Die Anzahl der Waschschrte richtet sich nach der Strahlung des Blots. Der Blot wird zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MS) in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie bei –80°C exponiert und nach einem Tag entwickelt.

### 2.6.10 Koloniehybridisierung

Die Technik ermöglicht es die DNA von Bakterienkolonien direkt von der Agarplatte auf eine Membran zu transferieren dort zu binden und diese Membran für eine Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe einzusetzen. Die Durchführung erfolgt wie in Sambroks et al. beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird die Methode zur schnellen Identifizierung von Kolonien mit Integration eines DNA-Fragments in einen Vektor verwendet. Sie bietet sich an, wenn sehr viele Kolonien analysiert werden sollen.

### 2.6.11 Klassische Klonierung von DNA und ET Klonierung

Unter dem Begriff Klonierung versteht man das künstliche Zusammenfügen von DNA-Fragmenten. In der Arbeit werden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Bei der klassischen Methode wird die DNA mit einem Restriktionsenzym gespalten und ein DNA Fragment mit passenden kohäsiven oder geraden Enden, dass entweder selbst durch einen Restriktionverdau oder durch eine PCR erzeugt wird, mittels einer Ligase eingefügt (siehe Sambrooks et al.). In der Arbeit werden folgende Plasmide als Klonierungsvektoren verwendet: pBlueskript® II SK<sup>+</sup> (Promega), pCAPS (136), pGEM®TEasy (Promega).

Die Methode des ET Klonierens beruht auf homologer Rekombination zwischen DNA mit gleicher Sequenzabfolge vermittelt durch mehrere Enzyme, die ursprünglich aus Phagen stammen. Beim ET Klonieren werden die Rekombinationenzyme RecE und RecT eingesetzt, die aus dem *Rac* Phagen stammen und mittels des Expressionsvektors pSC101-BAD-gba der Firma Genebridges in fast alle *E. coli* Stämme eingeschleust werden können. In der Arbeit wird die Methode der ET Klonierung verwendet um PCR Produkte homolog in einen BAC und in ein subkloniertes Genfragment einzubringen.

#### 2.6.11.1 Integration einer geflochten Neokassette und einer Restriktionsschnittstelle in ein subkloniertes Genfragment mittels ET Klonierung

Die Bakterien, in denen das Plasmid pBlueskript®SKII mit dem zu verändernden Gen-Fragment *IL-12/IL23 p40* vorliegt, werden durch Elektroporation des Vektors pSC101-BAD-gba ET-kompetent. Die Bakterien werden auf Tetracyclin-haltigem Agar hinsichtlich der Aufnahme dieses Vektor selektioniert. Davon werden Kolonien in 1ml Medium (LB-Medium + Tetracyclin<sup>+</sup> Ampicillin) über Nacht bei 30°C im Schüttelinkubator inkubiert da der ET-Klonierungsvektor einen temperatursensitiven Replikationsstartpunkt enthält, so dass das Plasmid bei Temperaturen über 30°C nicht repliziert wird. Am nächsten Tag werden 30µl der Kultur in 1,4 ml frisches Medium überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 bei 30°C

inkubiert. Dann wird der Kultur L-Arabinose in einer Konzentration von 0,1 - 0,2 % zugesetzt und die Bakterien werden bei einer Temperatur von 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Das führt zur Transkription der Rekombinationsenzyme die durch einen L-Arabinose induzierbaren Promotor kontrolliert wird. Durch die erhöhte Temperatur erfolgt eine effektive Expression der Rekombinationsenzyme so dass die Rekombination direkt nach der Elektroporation des PCR-Produkts erfolgen kann. Gleichzeitig wird das ET-Plasmid bei 37°C nicht weiter repliziert, so dass weitere unerwünschte Rekombinationsereignisse ausgeschlossen werden. Die Bakterien werden für 30 s bei in einer gekühlten Tischzentrifuge bei 110000 x g pelletiert und dreimal in kaltem 10% igem Glycerin gewaschen. Zuletzt werden die Zellen in 50 µl Glycerin aufgenommen und mit dem PCR-Produkt in einer Küvette vermischt. Die Elektroporation erfolgt am BioRad Genpulsar II bei 1350 V, 600 Ω und 25µF. Nach der Elektroporation wird den Bakterien sofort warmes LB-Medium ohne Antibiotika zugesetzt und es folgt eine Inkubation bei 37°C für 70 min. Die Bakterien werden danach auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (25 µl/ ml) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Es wachsen nur Kolonien heran, in denen das PCR-Produkt mit der Neokassette in das Plasmid integriert wurde.

Auf gleiche Weise wurde das ET Klonieren verwendet um eine loxP Sequenz zusammen mit einem Selektionsmarker in einen BAC einzubringen. Die Bakterien werden dazu mit den entsprechenden Antibiotika im Medium (s. 2.7.5) wie oben beschrieben inkubiert und aufgearbeitet und nach der Elektroporation auf LB-Agar mit Kanamycin (20 µg/ ml) ausplattiert.

Als Matrizen für die PCR-Produkte werden folgende Plasmide verwendet:

pgk-neo-loxP (Genebridges), pgkneoFRTmut (Genebridges/ eigene Herstellung), pCAPS neoflox (eigene Herstellung).

Sequenzinformationen zu den Matrizen und den verwendeten Primern befinden sich im Anhang. Die Oligonukleotide werden von BioSprings (Frankfurt) bezogen.

### 2.6.12 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Klonierung von PCR Produkten, die mittels Taq-Polymerase erzeugt werden, erfolgt durch TA Klonierung mit dem pGEM®- TEasy Vector System von Promega

## 2.7 Bakterien

### 2.7.1 Escherichia coli Zelllinien

Dh5 $\alpha$  chemokompente E.coli (Invitrogen)

Genotyp: F<sup>-</sup>,  $\Phi$ lacZ  $\alpha$  M15, endA1, recA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>), supE44, thi-1, gyrA96, relA1,  $\Delta$  (lacZYA-argF)U169,  $\lambda$ <sup>-</sup>

### 2.7.2 Cre exprimierende E.coli

*E. coli* 294-Cre (137) von Genebridges

### 2.7.3 Flp exprimierende E.coli

*E. coli* 294-Flp (137) von Genebridges

### 2.7.4 Bakterienmedien:

LB-Flüssigmedium und LB-Agarplatten

### 2.7.5 Verwendete Antibiotika:

Ampicillin	Endkonzentration im Medium für Bakterien mit pBlueskript® II SK <sup>+</sup> : 100 $\mu$ g/ml
Kanamycin:	Endkonzentration für pBlueskript® II SK <sup>+</sup> mit Neokassette: 25 $\mu$ g/ml Endkonzentration für BACs mit Neokassette: 20 $\mu$ g/ml
Tetracyclin:	Endkonzentration für den ET-Vektor pSC101-BAD-gba: 3 $\mu$ g/ml
Chloramphenicol:	Endkonzentration für BACs: 20 $\mu$ g/ml

## 2.8 Arbeiten mit primären murinen Zellen

In der Arbeit werden Zellen aus Blut, Milz, inguinalen Lymphknoten, Peyerschen Platten, mesenterialen Lymphknoten, Knochenmark und Peritoneum isoliert und für FACS-Analysen, mRNA-Arrays und Induktionsexperimente verwendet.

Die Zellen werden dabei alle auf die gleiche Art isoliert, Abweichungen gibt es in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Anzahl an Zellen, die aus den versch. Organen isoliert werden können, lediglich in der Menge der verwendeten Puffer. Alle Zentrifugationschritte erfolgen, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C. Die isolierten Zellen werden bis zur weiteren Verwendung aus Eis gelagert.

Die Präparation der Zellen erfolgt in sterilfiltriertem, kaltem PBS/ 0,2% BSA,. Die Lyse der Erythrozyten erfolgt mit dem Puffer BDPharm Lyse™ von BD. Dieser wird zur Verwendung 1:10 mit PBS/0,2% BSA verdünnt.

### 2.8.1 Verwendete Mauslinien

SRF neo-flex1: Maus mit gefloxtem Exon 1 des SRF Gens; (5)

CD19 Cre-Maus: Maus mit einem Knockin der Cre-Rekombinase in den CD19 Locus (138)

### 2.8.2 Entnahme von Blut und Herstellung von Serum

Die Mäuse werden in CO<sub>2</sub> getötet, auf einem Brett fixiert und mit 70% Ethanol desinfiziert. Der Brustraum wird mit einer Schere geöffnet und mit einer Spritze und Einwegkanüle werden ca. 50µl Blut aus dem Herzmuskel entnommen. Das Blut wird in 25 µl Heparin gegeben um die Gerinnung zu verhindern.

Für die Herstellung von Serum wird soviel Blut wie möglich aus dem Herzmuskel entnommen. Das Blut, dass sofort gerinnt, wird für 10 min bei 600 g in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser wird erneut zentrifugiert und der Überstand entnommen, der Rest wird verworfen. Das Serum kann bei –20°C gelagert werden.

### 2.8.3 Isolierung von Milzzellen

Die Maus wird mit CO<sub>2</sub> getötet, mit 70% Ethanol von außen etwas desinfiziert und auf einem Brett fixiert. Der Bauchraum wird mit einer Schere eröffnet und die Milz entnommen, dabei soll möglichst wenig Fett an der Milz verbleiben. Die Milz wird in eine Petrischale (Ø 5cm) mit 5 ml kaltem PBS/ 0,2 % BSA gegeben und mittels des Stempels einer 1 ml Spritze durch ein Zellsieb mit Porengröße 100 µm gedrückt. Die Zellen werden im Puffer gut resuspendiert, das Sieb mit 5 ml Puffer gespült und die Lösung in einem 50 ml Falcontube gesammelt. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Zellen auf Eis gelagert.

Die Zellsuspension wird bei 250g und 4°C in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 3 ml Lysispuffer aufgenommen, kurz resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den Lysispuffer werden Erythrozyten zerstört. Die Suspension wird auf 50 ml mit PBS/0,2% BSA aufgefüllt, erneut zentrifugiert (s.o.) und anschließend wird das Zellpellet in 5ml Puffer resuspendiert. Zur Entfernung von aggregierten Zelltrümmern kann die Suspension erneut durch ein Zellsieb mit Porengröße

100 $\mu$ M gegeben werden. Für die Zellzahlbestimmung wird eine 1:50 Verdünnung hergestellt und die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

### **2.8.4 Isolierung von Zellen der inguinalen Lymphknoten, mesenterialen Lymphknoten und Peyerschen Platten**

Die Durchführung der Zellisolierung erfolgt wie für die Milzzellen beschrieben. Die Lymphknoten bzw. Peyerschen Platten werden entnommen, durch ein Sieb gedrückt und die Zellen in 5 ml PBS/0,2% BSA aufgenommen. Nach der Zentrifugation wird die Erythrozytenlyse in 2 ml Lysispuffer durchgeführt und die Zellen zum Schluss in 1ml PBS/0,2% BSA aufgenommen. Gezählt wird ein unverdünntes Aliquot.

### **2.8.5 Isolierung von Zellen des Peritoneums (PECs)**

Die getötete Maus wird von außen mit 70% Ethanol desinfiziert und auf einem Brett fixiert.

Mit einer Schere werden das Fell und die Haut auf der Längsachse bis zur Brust aufgeschnitten und vorsichtig zur Seite abgezogen. Dabei darf das Bauchfell nicht verletzt werden. Mit einer Einwegkanüle wird PBS/0,2% BSA in den Bauchraum injiziert.

Mit einer Schere wird dann ein Loch in das Bauchfell geschnitten und mit einer Pasteurpipette der Puffer und die Peritonealzellen abgezogen. Die Suspension wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Bauchraum wird ein weiteres Mal mit PBS/0,2% BSA gespült und die Lösungen werden vereinigt.

Nach der Zentrifugation erfolgt die Erythrozytenlyse wie oben beschrieben in 2-3 ml Lysispuffer. Am Schluss werden die Zellen in 1 ml Puffer aufgenommen.

### **2.8.6 Isolierung von Knochenmarkszellen (BM)**

Knochenmark wird aus dem Ober und Unterschenkelknochen der beiden Hinterläufe isoliert. Dazu werden die Knochen freipräpariert und die Läufe im Bereich der Hüfte abgetrennt. Die Knochen werden in kleine Stücke geschnitten und in eine Petrischale ( $\varnothing$  10 cm) mit ca. 10 ml kaltem PBS/ 0,2% BSA gegeben. Mit einer 10 ml Spritze und einer Kanüle wird das Knochenmark mit Puffer wiederholt ausgespült, die Zellen in der Petrischale aufgefangen und durch ein Sieb (Porengröße 100 $\mu$ M) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Nach der Zentrifugation für 5 min bei 250g und 4°C erfolgt die Erythrozytenlyse in 5 ml Lysispuffer. Alle weiteren Schritte siehe Präparation von Milzzellen. Die Zellen werden in 2 ml PBS/0,2% BSA aufgenommen.

### **2.8.7 Antikörperfärbungen für FACS-Analysen**

Die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting), oder Durchflusszytometrie wird zum einen für das Sortieren von Zellen aufgrund unterschiedlicher Oberflächenmoleküle verwendet und zum anderen für die quantitative Bestimmung von Zellen mit bestimmten Oberflächenmarkern sowie deren Dichte auf der Zelloberfläche eingesetzt. Für Southern-Blot Analysen und für RNA-Arrays wurden Knochenmarks- und Milzzellen am FACS-Gerät MoFLO sortiert. Dazu werden die Zellen wie oben beschrieben isoliert und mit fluoreszenzgekoppelten T- bzw. B-zell-spezifischen Antikörpern (s. 2.8.8). B-Zellen werden aufgrund der IgM- und IgD-Expression in die Populationen IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> sortiert. Für die Southern-Blot Analyse des *Srf*-Deletionsgrads werden B- und T-Zellen aus der Milz und die beiden B-Zellpopulationen aus dem Knochenmark sortiert und die DNA aus jeweils 500000 Zellen für die Southern-Blot Analyse eingesetzt.

Für die RNA-Arrays werden die B-Zellen der Milz sortiert und mindestens 100000 Zellen pro Population und Genotyp für die Isolierung der RNA eingesetzt. Die Durchführung der Färbung erfolgt wie unten beschrieben.

Für die Expressionsanalysen verschiedener Oberflächenmarker werden die Zellen aus Milz, Blut, Peyerschen Platten, mesenterialen und peripheren Lymphknoten einzelner Mäuse mit den unter 2.8.8 aufgeführten Antikörpern markiert. Dabei werden zwischen  $1 \times 10^6$  und  $2 \times 10^6$  Zellen pro Färbung eingesetzt (für Sortierungen werden alle Zellen verwendet). Die Zellen werden in 100 µl Färbelösung 15 min auf Eis und im Dunkeln in Eppendorfgefäßen oder in 96 Loch- Platten inkubiert. Die Färbelösung enthält die fluoreszenzmarkierten Antikörper verdünnt in PBS/0,2%BSA mit 1% Rattenserum (PromoCell). Danach werden die Zellsuspensionen mit Puffer aufgefüllt, zentrifugiert, einmal mit Puffer gewaschen und in insgesamt 300 µl Puffer aufgenommen. Die Lösung wird in FACS Röhrchen überführt. Die Messung wird am FACS Calibur durchgeführt, die Auswertung erfolgt mit dem Programm Flowjo.

### **2.8.8 Antikörper in der FACS-Analyse**

PE-Cy5 konjugierter anti-mouse CD4 (L3T4) von eBiosciences (139)

PE-Cy5 konjugierter Rat antimouse CD8 (alpha subunit) von eBiosciences (140)

Ledbetter, J. A. and L. A. Herzenberg (1979).

FITC (Fluorescein Isothiocyanate)-konjugierter Hamster anti-Ratte CD29 (Integrin  $\beta_1$ -Kette) monoklonaler Antikörper von Pharmingen (Katalog-Nr.: 555005) (141)

PE (Phycoerythrin)-konjugierter Ratte anti-Maus Integrin  $\beta_7$ -Kette monoklonaler Antikörper Von Pharmingen (Katalog-Nr.: 557498) (142, 143)

Allophycocyanin (APC)- konjugierter Ratte anti-Maus CD19 monoklonaler Antikörper von BD Biosciences (Katalog-Nr. 550992)(144)

Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- konjugierter Ratte anti-Maus CD49b/Pan NK Zellen monoklonaler Antikörper von BD Biosciences (Katalog-Nr. 553857)(145)

R. Phycoerythrin (RPE)- konjugierter Ratte anti-Maus F4/80 Antigen monoklonaler Antikörper von Serotec (Katalog-Nr. MCA497PE) (146)

Phycoerythrin (PE)- konjugierter Ratte anti- Maus Ly-6G, Gr-1 monoklonaler Antikörper von eBiosciences (Katalog-Nr.: 12-5931) (147)

Fluorescein Isothiocyanat (FITC)- konjugierter Ratte anti-Maus Ly-G6, Gr-1 monoklonaler Antikörper von eBiosciences (Katalog-Nr.: 11-5931)(147)

Fluorescein Isothiocyanat (FITC)- konjugierter Ratte anti-Maus CD102 (ICAM-2) monoklonaler Antikörper von BD Biosciences (Katalog-Nr.: 557444) (148)

R- Phycoerythrin (R-PE)- konjugierter Maus anti-Maus CD22.2 (Lyb-8.2) monoklonaler Antikörper von BD Biosciences (Katalog-Nr.: 553384) (149).

Biotinylierter Ratte anti-Maus CD184 (CXCR4) Monoklonaler Antikörper von BD Biosciences (Katalog-Nr.: 551968) (150).

R- Phycoerythrin (R-PE)- konjugierter Hamster anti-Maus CD48 (BCM1) monoklonaler Antikörper von BD Biosciences (Katalog-Nr.: 557485) (151).



### 2.8.8.1 Mix zum Sortieren

IgM-PE, IgD-FITC, CD19-APC, CD8-PE-Cy5, CD4-PE-Cy5, PI (Propidium-Iodid färbt tote Zellen an, die so aus der Analyse „entfernt“ werden können)

### 2.8.8.2 Mix für hämatopoietische Zellen

CD19-APC, CD49-FITC, F4/80-PE, Gr1-FITC, Gr1-PE, IgM-PE, IgD-FITC, CD4-Cy, CD8-Cy, Propidium-Iodid

### 2.8.8.3 Marginalzonen B-Zell Mix

CD21/35-FITC, CD23-PE, CD19-APC, Propidium-Iodid

### 2.8.8.4 CXCR4-Mix

CD4-Cy, CD8-FITC, CD19-APC, CXCR4- Bio (2. Antikörper: Streptavidin-PE)

### 2.8.8.5 CD48-Mix

CD19-APC, CD8-FITC, CD4-Cy, CD48-PE, Propidium-Iodid

### 2.8.8.6 $\beta$ -1/-7 Integrin- Mix

$\beta$ -7-PE,  $\beta$ -1 FITC, CD19-APC, CD4-Cy, CD8-Cy

### 2.8.8.7 CD5- Mix

CD5-Cy, IgM-PE, CD19-APC

### 2.8.8.8 IgM/ IgD Mix

IgM-PE, IgD-FITC, CD19-APC, Propidium-Iodid

### 2.8.8.9 ICAM-2 Mix

CD19-APC, CD4-PE, CD8-Cy, ICAM-2-FITC, Propidium-Iodid

### 2.8.8.10 CD22-Mix

CD19-APC, CD8-FITC, CD4-Cy, CD22-PE, Propidium-Iodid

## 2.8.9 Antikörperkonjugation

Die Konjugation des Ratte-anti-Maus-IgM (Klon 1.3; (152) und Maus anti-Maus IgD (Hybridom R33-24; (153) mit den Fluorochromen Alexa 594 bzw Alexa 647 erfolgt mit Kits

der Firma Molecular Probes nach Angaben des Herstellers. Es wurden für jede Konjugation 100µg Protein eingesetzt.

### 2.8.10 Isolierung von RNA für mRNA Arrays

Für die RNA Chip Analyse wird pro Probe die RNA aus mindestens 100000 Zellen benötigt. Diese Anzahl an Zellen wird in RLT Puffer (Kit von Qiagen) aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C gelagert.

Die weitere Probenaufarbeitung und Durchführung der Arrays sowie die Analyse der Daten erfolgte in der Array-Facility der GBF durch Dr. Robert Geffers und Mitarbeiter. Folgende Chips wurden verwendet:

MOE 430 A ([http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/mouse430\\_2.affx](http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/mouse430_2.affx))

MOE 430 2.0 (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/mouse430.affx>)

Für die Analyse wurden folgende Programme verwendet:

Affymetrix Microarray Suite 5.0, Affymetrix MicroDB 3.0 und Affymetrix Data Mining Tool 3.0.

### 2.8.11 Messung der Kalzium-Mobilisierung

$1 \times 10^7$  primäre Milzzellen werden in 1ml DMEM Medium aufgenommen und mit 50µg Indo-1 (Indo-1 AM; Molecular Probes) in 50µl DMSO versetzt. Es folgt eine Inkubation für 45 min bei 37°C und 7.5% CO<sub>2</sub>. Anschließend werden die Zellen mit 400g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und zweimal mit PBS/0,2% BSA gewaschen.

Die Zellen werden in 500µl DMEM aufgenommen und 15 min auf Eis mit dem Antikörper anti-CD19-APC markiert. Anschließend werden die Zellen zweimal gewaschen und in 500 µl Medium aufgenommen. Davon werden je 100 µl ( $= 2 \times 10^6$  Zellen) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu 300 µl DMEM Medium gegeben.

Zur Stimulierung der Zellen wird goat anti-mouse IgM F(ab')<sub>2</sub> in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Als positiv Kontrolle für den Kalzium-Flux wurde Ionomycin (Molecular Probes) in einer Konzentration von 1µM eingesetzt. Die Messung erfolgt am FACS-MoFlo, die Auswertung mit dem Programm Flowjo.

### 2.8.12 Bestimmung des Serum-Immunglobulingehalts

Die Durchführung erfolgte mit dem Cytometric Bead Array Mouse Immunglobulin Isotyping Kit (BD, Biosciences) nach Angaben des Herstellers. Die Messung wurde am FACS-Calibur durchgeführt.

### **2.8.13 FACS-Geräte**

FACS Calibur, FACS MoFlo und FACS-Röhrchen von BD Bioscience, Heidelberg

## **2.9 Histologische Untersuchungen**

### **2.9.1 Antikörper in der Histologie**

Fluorescein Isothiocyanat (FITC)- konjugierter Ratte anti-Maus metallophilic Macrophagen von Serotec (Katalog-Nr.: MCA947F) (154)

Ratte anti-Maus IgM (153) wurde konjugiert mit dem Farbstoff Alexa Fluor™594 (Kit zur Konjugation und Farbstoff von Molecular Probes)

Maus anti-Maus IgD (152) wurde konjugiert mit dem Farbstoff Alexa Fluor™647 (Kit zur Konjugation und Farbstoff von Molecular Probes)

### **2.9.2 Entnahme und Aufarbeitung von Organen für Parafinschnitte**

Für histologische Untersuchungen an Parafinschnitten wurden die entnommenen Organe (Milz, Darm und inguinale Lymphknoten) in Einbettförmchen zwischen zwei Whatmanpapiere gelegt und in 4%Formaldehyd in Natriumphosphatpuffer bei Raumtemperatur über Nacht fixiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Achim Gruber.

### **2.9.3 Entnahme und Aufarbeitung von Organen für Kryoschnitte**

Die Milz und verschiedene Lymphknoten werden wie oben beschrieben entnommen, in Plastikförmchen in Tissue-Tek™ OCT™ (Sakura) eingelegt und auf Trockeneis eingefroren. Die gefrorenen Organe werden in Alufolie gewickelt, beschriftet und bei –80°C gelagert.

### **2.9.4 Anfertigung von Kryoschnitten**

Die Innentemperatur des Kryostats (Shandon) und des Schneideblock werden entsprechend der Empfehlung der Hersteller auf die optimale Temperatur für das zu schneidende Organ eingestellt. Das Organ wird aufgeblickt und Schnitte mit einer Dicke zwischen 10-7µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Vectabond™-beschichtete Objektträger aufgebracht und ca. 30 min auf einem Heizblock bei 50°C getrocknet (Vector Laboratories).

Zur Lagerung werden die OTs in Schachteln verpackt und bei –80 C aufbewahrt.

Zur Vermeidung von Kondenswasser beim Auftauen werden die Schachteln in verschließbare Tüten verpackt und auch darin aufgetaut.

### **2.9.5 Antikörperfärbung auf Kryoschnitten**

Die Schnitte werden aufgetaut und in Azeton auf Eis für 6 min fixiert. Dann werden die Schnitte getrocknet und mit einem Wachsstift (DAKOPen) umrandet.

Es folgt eine Inkubation in TBS-T für 5 min und eine Inkubation mit 5% Rattenserum in TBS-T für 15 min bei Raumtemperatur.

Danach werden die fluoreszenzmarkierten primären Antikörper verdünnt in TBS-T mit 2% Rattenserum auf die Schnitte gegeben und für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgen drei Waschschritte für je fünf Minuten mit TBS-T. Das Einbetten der feuchten Schnitte erfolgt in Fluoroprep (bioMérieux sa). Die Schnitte werden über Nacht im Kühlschrank getrocknet. Die Photos werden an dem Zeissmikroskop Axioplan 2 mit Filtern der Firma AHF Analysentechnik und der Kamera Orca ER von Hamamatsu erstellt. Das dazu verwendete Programm ist Sipmle PCI von Hamamatsu.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung von *targeting*-Konstrukten zur konditionalen Mutagenese unter Verwendung der Technik des ET Klonierens

Ein Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von *targeting*-Konstrukten, mit denen sich Gene zelltypspezifisch und/oder induzierbar ausschalten lassen. Bei der konditionalen Mutagenese werden Mäuse generiert, in denen Teile der ausgewählten Gene mit den Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase (loxP Sequenzen) flankiert sind. Verpaarung dieser sog. geflochtenen Mäuse mit transgenen Mäusen, die eine zelltypspezifische oder induzierbare Cre-Rekombinase exprimieren, bewirkt in Folge die Deletion des entsprechenden Gens. An ein *targeting*-Konstrukt für die konditionale Mutagenese werden spezifische Anforderungen gestellt. Es muss die Teile des Gens enthalten, die später deletiert werden sollen, flankiert von loxP Sequenzen und einen Selektionsmarker, der es ermöglicht, die mit dem Konstrukt transfizierten ES-Zellen auf Rekombinationsereignisse zu selektieren. Dieser Selektionsmarker sollte nach der Identifizierung der ES-Zellen mit homologer Rekombination wieder entfernt werden können. Um dies zu erreichen, wird er mit Erkennungssequenzen für die Flp-Rekombinase (FRT Sequenzen) versehen. Für eine optimale homologe Rekombination des Konstrukts in das Genom der ES-Zelle werden außerdem möglichst lange Sequenzen homolog zum Zielgen benötigt.

Zusätzlich muss eine Strategie erarbeitet werden um später die homologe Rekombination des Konstrukts in ES-Zellen, die Deletion des Selektionsmarkers und die Deletion des Gens nachweisen zu können.

Ausgehend von Sequenzinformationen aus ENSEMBL wurden die Strategien zur Herstellung der beiden *targeting*- Konstrukte entwickelt. Zunächst wurde anhand der Intronphasen der Gene der zu deletierende Bereich festgelegt. Die Intronphase sagt aus, an welcher Position ein kodierendes Basentriplett durch das folgende Intron unterbrochen wird. Bleiben nach der Deletion von Teilen eines Gens kodierende Sequenzen mit gleicher Intronphase übrig, so besteht die Möglichkeit, dass ein Restprotein translatiert wird. Besitzt dieses noch teilweise Funktionen des ursprünglichen Proteins, wie z.B. Bindungsstellen für Rezeptoren oder Interaktionspartner, kann das Restprotein dominant- negative Wirkungen zeigen, so dass es sich nicht um einen Knockout des Gens handelt.

### 3.1.1 Herstellung des IL-12/IL-23 p40 *targeting*-Konstrukts

Auf der Grundlage der Sequenzinformation für das IL-12/IL-23 p40 Gen wurde eine Strategie zur Erzeugung des *targeting*-Konstrukts erstellt. Nach der Analyse der Intronphasen des Gens wurde beschlossen die Exone 3-6 durch loxP Sequenzen zu flankieren. Beim Ressourcenzentrum in Berlin wurde ein BAC- Klon bestellt (Klon RP23-288A3), der das p40 Gen enthalten sollte. Um dies zu überprüfen, wurde eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt, und ein Fragment zwischen Exon 3 und Exon 4 amplifiziert.

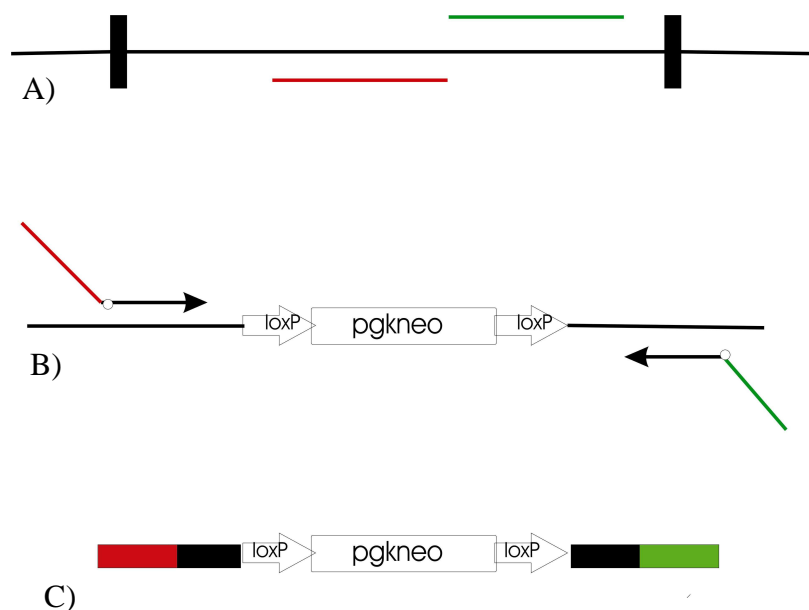
Aus der BAC-DNA wurde ein ca. 8 kb langes *Bam*HI-Fragment, welches die Exone 2 bis 6 enthielt, in den Vektor pBlueskriptSKII® kloniert.

Dazu wurden die BAC-DNA und der Vektor pBlueskriptIISK mit *Bam*HI gespalten und elektrophoretisch im Gel aufgetrennt. Der linearisierte Vektor und der Bereich der BAC-DNA mit einer Größe von ca. 8 kb wurden aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Das Genfragment wurde dann über eine Ligation in den Vektor subkloniert und der Ligationsansatz in *E. coli* eingeschleust. Die Analyse der erhaltenen Kolonien erfolgte mittels Koloniehybridisierung (s. Kap. 2.6.11 und 2.6.12). Es konnten zwei Kolonien identifiziert werden, die ein positives Signal nach Hybridisierung mit einer genspezifischen Sonde lieferten.

Die DNA dieser Klone wurde isoliert, mit *Bam*HI gespalten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Beide Klone enthielten das gewünschte Insert mit einer Größe von 8 kb.

Mit einer PCR über den Bereich zwischen Exon 3 und Exon 4 und Sequenzierungen mit verschiedenen Primern (s. Anhang) wurde bestätigt, dass der Vektor das gewünschte p40 Gen-Fragment mit den Exonen 2 bis Exon 6 enthielt.

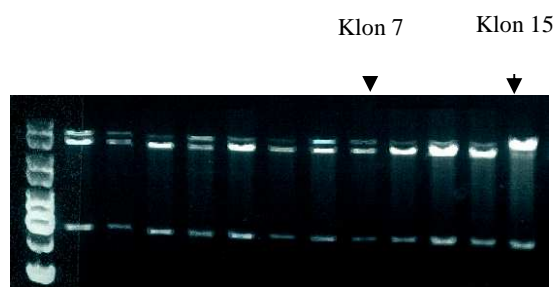
Der Vektor mit dem subklonierten Genfragment wurde durch Elektroporation in ET-kompetente *E. coli* Bakterien eingeführt. Diese Bakterien enthalten das Plasmid pSC101-BAD-gba, auf dem die Information zur Expression der ET Rekombinationsenzyme kodiert ist. Die Bakterien wurden wie in Kap. 2.6.13 beschrieben vorbereitet und die Expression der Enzyme RecE und RecT durch L-Arabinose induziert. Durch eine PCR, bei der als Matrize ein mit loxP Sequenzen flankiertes Neomycingen eingesetzt wurde, wurde mit Hilfe langer Primer ein Fragment erzeugt, das am 3' und 5' Ende jeweils 50 zur Zielsequenz homologe Basenpaare enthielt, außerdem die Neokassette flankiert von zwei loxP Sequenzen in gleicher Orientierung und eine *Eco*RI Restriktionssequenz (s. Abb.3.1 ).



**Abb. 3.1.: Erzeugung eines PCR-Produkts für die homologe Rekombination in *E. coli*.**

- A) zeigt ein Gen mit der 100 bp langen Zielsequenz für die Integration in rot und grün.
- B) Diese Sequenzen und ein Bereich homolog zur Matrize werden zur Herstellung von zwei Primern verwendet.
- C) Das PCR Produkt enthält die gefloxt Neokassette und am 5' und 3' Ende je 50 bp homolog zur Zielsequenz.

Dieses PCR-Produkt wurde mittels Elektroporation in die vorbereiteten ET-kompetenten Bakterien eingeschleust. Eine Selektion der Bakterien erfolgte auf Kanamycin-haltigem Agar. Nur Bakterien, die das PCR-Produkt mit der Neokassette integriert hatten, konnten Kolonien bilden. Von diesen Kolonien wurden Flüssigkulturen angelegt und daraus die DNA isoliert. Durch einen *Bam*HI-Verdau wurde nachgewiesen, dass das IL-12p40-Fragment um die Länge des PCR-Produkts größer wurde und damit die gefloxt Neokassette mittels homologer Rekombination integriert hatte. Abb. 3.2 zeigt *Bam*HI Spaltungen von DNA aus verschiedenen Klonen nach der ET Klonierung. Man erkennt, dass es sich bei den meisten dieser Klone um Mischklone handelt, die in verschiedenen Anteilen sowohl Plasmide mit integrierter Neokassette als auch ursprüngliches Plasmid ohne Neokassette enthalten. Diese Plasmidformen lassen sich durch erneute Transformation von *E. coli* teilweise trennen (siehe dazu auch die Herstellung des *targeting*- Konstrukts für das *Ifngr2*-Gen). Klon 15 jedoch enthielt nur das durch die ET Klonierung vergrößerte Insert. Bevor mit dieser DNA weitergearbeitet wurde, wurde durch Sequenzierung ausgehend von Exon 4 bestätigt, dass die Neokassette, die loxP Sequenz und die EcoRI Schnittstelle integriert wurden.



**Abb. 3.2: *Bam*HI Spaltungen von Plasmid DNA verschiedener Klone nach ET Rekombination**

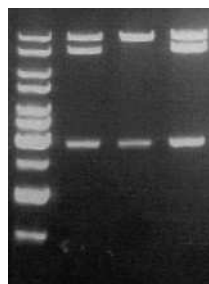
Die oberste Bande verläuft bei ca. 9,6kb und repräsentiert das um die Neoflox-Kassette erweiterte Insert. Dieses weist ohne ET Rekombination eine Größe von 8 kb auf. Man sieht Klone mit verschiedenen Anteilen der beiden Plasmide. Klon 15 enthält hauptsächlich das rekombinierte Plasmid, Klon 7 dagegen hauptsächlich das ursprüngliche Plasmid (s. Pfeile).

In Folge wurde die DNA von Klon 15 in einen *E. coli* Stamm eingeschleust, der die Cre-Rekombinase unter einem temperatursensitiven Promotor exprimiert (*E. coli* 294-Cre; (137).

In diesen Bakterien sollte die Neokassette mit Hilfe der Cre-vermittelten Rekombination deletiert werden, eine loxP Sequenz und die *EcoRI* Schnittstelle in 5' Richtung von Exon 3 sollten erhalten bleiben. Die erfolgreiche Deletion wurde durch eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* nachgewiesen. Die zweite loxP Sequenz sollte mittels ET Klonierung in 3' Richtung von Exon 6 zusammen mit einer Neokassette, die von zwei FRT Sequenzen flankiert ist, integriert werden. Da diese Neokassette als Selektionsmarker in *E. coli* und in ES-Zellen dienen soll, besitzt die Neokassette sowohl einen prokaryotischen als auch einen eukaryotischen Promotor.

Das für die PCR als Matrize vorgesehene Plasmid pgk neo-frt der Firma Genebridges lieferte jedoch mit keinem der verwendeten Primerpaare ein PCR-Produkt. Daher wurde die Neokassette aus dem Plasmid pgk-neo-loxP (Genebridges) durch eine PCR amplifiziert und dabei mittels langer Oligonukleotide mit zwei FRT3 Sequenzen flankiert (155). Bei diesen Sequenzen handelt es sich um mutierte FRT Sequenzen, die ebenfalls von der Flp-Rekombinase erkannt werden, aber nur miteinander rekombinieren, jedoch nicht mit den ursprünglichen FRT Sequenzen. Dieses PCR-Produkt wurde über TA-Klonierung in den pGEM<sup>TM</sup>Teasy-Vektor eingebracht. Das resultierende Plasmid diente als Matrize zur Erzeugung eines PCR-Produkts mit 50 bp homologer Sequenz zum Zielgen. Die loxP Sequenz die in 3' Richtung von Exon 6 integriert werden sollte, wurde in den 5' Primer integriert (s. Anhang).

Die Durchführung des ET Klonierens erfolgte wie oben beschrieben. Die Integration von Neokassette und loxP Sequenz wurde mit Restriktionsverdaus nachgewiesen und durch Sequenzierung des Bereichs 3' von Exon 6 bestätigt (s. Abb. 3.3).



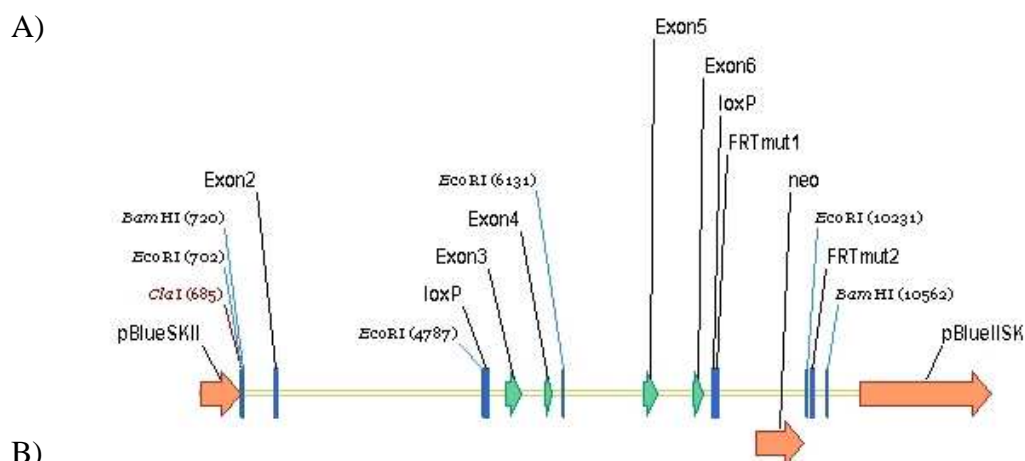
**Abb.3.3: IL-12/IL-23 p40 Klone nach Integration der neo-FRT3-Kassette und loxP Sequenz**

Bei Klon 1 und 3 handelt es sich um Mischklone. Klon 2 weist nur das vergrößerte Insert auf und wurde daher weiterverwendet.



Die Frequenz der homologen Rekombination eines Konstrukts in ES-Zellen hängt unter anderem von der Länge der homologen Bereiche zwischen Konstrukt und Genlocus ab. Aus diesem Grund wurde der 3'Arm des Konstrukts, der bisher ca. 500 bp betrug, um ca. 1 kb verlängert. Die hierfür notwendige DNA wurde mit einer PCR aus dem oben angeführten BAC-Klon amplifiziert und über eine Ligation in das Konstrukt eingeführt. Im vollständigen Konstrukt, das in Abb. 3.4 A dargestellt ist, mussten nun noch die loxP und FRT Sequenzen auf ihre Funktionalität überprüft werden. Dazu wurde das Konstrukt in Cre- bzw. Flp-exprimierende Bakterien eingeschleust (*E. coli* 294-Cre und *E. coli* 294 Flp (137)) und die aus den Kolonien gewonnen Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdau überprüft.

Abb.3.4 B zeigt das Konstrukt sowie einen *Bam*HI-Verdau des Konstrukts nach Cre- und Flp-vermittelter Rekombination und des Originalkonstrukts.



**Abb.3.4 :**

**A) Grafische Darstellung des targeting-Konstrukts für die konditionale Mutagenese des murinen IL-12p40 Gens.**

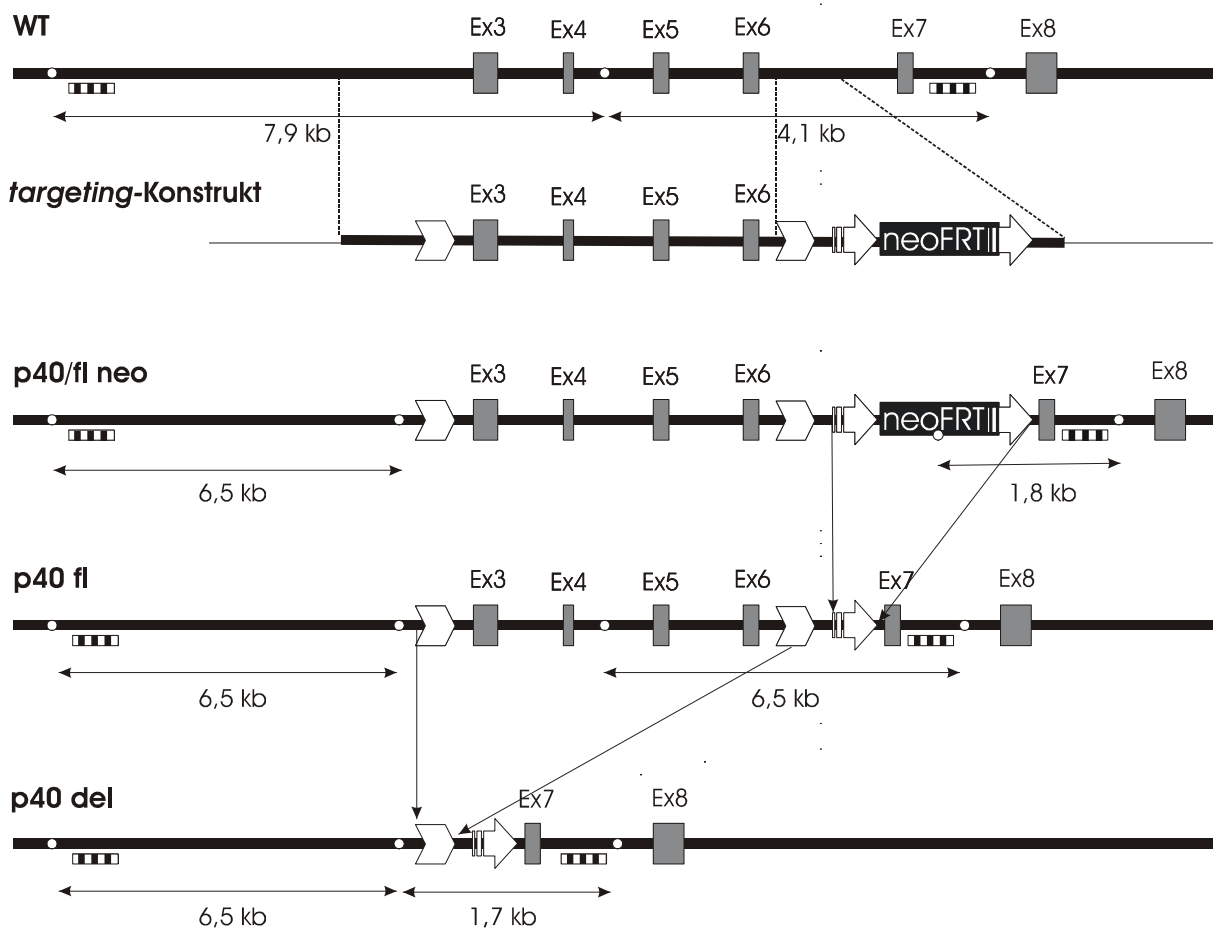
**B) Test der Funktionalität der loxP und frt Sequenzen**

Gezeigt sind *Bam*HI Spaltungen des Konstrukts isoliert nach Cre-vermittelter Rekombination (1) , Flp-vermittelter Rekombination (2) und das Originalkonstrukt (3). Man sieht, dass die Größe der Insertbande nach Cre- und Flp-vermittelter Deletion abnimmt. (M = Marker)

Um die homologe Rekombination, die Deletion der Neokassette und die Cre-vermittelte Deletion der Exone 3-6 in ES-Zellen und in Mäusen nachweisen zu können, wurde eine Southern-Blot Strategie entwickelt. Es wurden mittels PCR je eine Sonde für das 3' und für das 5' Ende des Konstrukts erzeugt.

Beide Sonden liegen außerhalb des Konstrukts aber innerhalb der zwei *EcoRI* Schnittstellen, die im Wildtyp-Gen 3' von Exon 1 und Exon 7 liegen.

Abb. 3.5 verdeutlicht die Southern-Blot Strategie und zeigt, welche Signale auf einem Southern-Blot nach der Hybridisierung zu erwarten sind.



**Abb. 3.5: targeting-Konstrukt und Southern-Blot Strategie für die konditionale Mutagenese des murinen p40 Gens.**

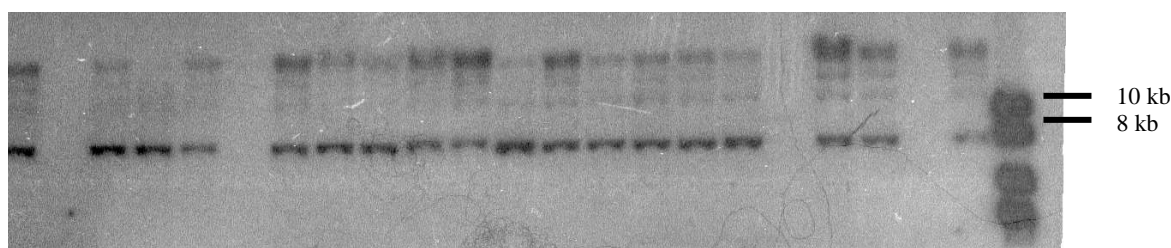
WT= Wildtyp Locus des p40 Gens ; p40/fl neo= Locus nach homologer Rekombination des targeting-Vektors; p40fl= Locus nach Deletion der Neokassette; p40 del= Locus nach Cre-vermittelter Deletion der Exone 3-6.

◁ = loxP; ▷ = FRT3; ○ = *EcoRI*-Schnittstellen; ■■■ = Sonden

Bei homologer Rekombination des Konstrukts p40/fl neo wird nach der Hybridisierung des Southern-Blots mit der 5' Sonde eine Bande von ca. 6,5 kb erwartet, die 3' Sonde sollte eine Bande von 1,8 kb liefern. Dagegen wird ohne Rekombination beim Wildtyp eine Bande von 7,9 kb mit der 5' Sonde und eine Bande von ca. 4,1 kb mit der 3' Sonde erwartet (s.Abb.3.2). Nach der homologen Rekombination soll die Neokassette aus dem Genom entfernt werden. Dies kann in den ES –Zellen erfolgen, indem ein Flp-Rekombinase exprimierendes Plasmid transient in die ES-Zellen transfiziert wird, oder durch die Verpaarung von Mäusen, die das Originalkonstrukt integriert haben, mit sogenannten Flp-Deletermäusen. Diese exprimieren die Flp-Rekombinase unter einem Oozyten spezifischen Promotor, woraufhin die Neokassette in der Eizelle deletiert wird.

Der Nachweis der Neo-Deletion soll mit der 3'Sonde erfolgen. Die Neo-Deletion führt zum Verlust der *EcoRI* Schnittstelle innerhalb der Neokassette, so dass die resultierende Southern-Blot Bande mit der 3' Sonde bei 4,2 kb verläuft, ohne Neo-Deletion verläuft sie wie oben beschrieben bei 1,8 kb.

Die Verpaarung der p40 flox Mäuse mit transgenen die Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen sollte zur Deletion der Exone 3 bis 6 zwischen den loxP Sequenzen führen. Hiermit verändert sich die resultierende Southern-Blot Bande mit der 3' Sonde auf eine Größe von 6,3 kb. Das *targeting*-Konstrukt wurde mit dem Enzym *ClaI* linearisiert und für vier Transfektionen in F1 ES-Zellen eingesetzt. Bisher wurden ca. 1500 Neomycin-resistente Klone mittels Southern-Blot analysiert. Dabei konnte bisher kein Klon mit homologer Rekombination identifiziert werden. Abb. 3.6 zeigt einen genomischen Southern Blot von ES-Zell-Klonen hybridisiert mit der 5' Sonde. In Kapitel 4 werden einige Möglichkeiten zu Veränderung des Konstrukts besprochen.



**Abb. 3.6: Genomischer Southern-Blot von ES-Zellklonen, transfiziert mit dem p40 targeting-Konstrukt**  
Die WT-Bande verläuft bei ca. 8kb.

### 3.1.2 Herstellung des *Ifngr2 targeting*-Konstrukts

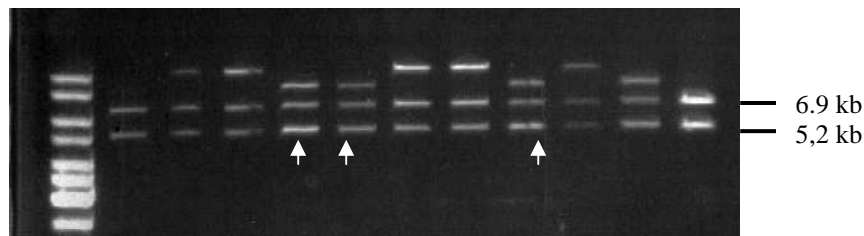
Zunächst wurde auf Grundlage der Sequenzinformationen des Gens eine Strategie zur Erzeugung des *targeting*-Konstrukts entwickelt. Nach Analyse der Intronphase wurde beschlossen die Exone 4- 6 durch die loxP Sequenzen zu flankieren. Exon 4 und 5 kodieren für einen Teil der extrazellulären Domäne, Exon 6 beinhaltet die Information für die Transmembrandomäne und einen Teil der intrazellulären Domäne (156, 157).

Beim Ressourcenzentrum Berlin wurde ein BAC Klon bestellt, der die Sequenz des IFNGR2 Gens enthält (RP23-207P1). Verifiziert wurde dies durch eine spezifische PCR, die ein DNA-Fragment zwischen Exon 4 und Exon 5 amplifiziert.

Mittels ET Klonierung wurde in die BAC-DNA eine Neokassette flankiert von zwei loxP Sequenzen vor das vierte Exon eingefügt. Dazu wurden die das BAC enthaltenden Bakterien mit dem ET-Plasmid transformiert. Es wurde ein PCR-Produkt mit zur Zielsequenz homologen Enden, einer geflochten Neokassette und einer *XhoI* Schnittstelle hergestellt und mittels Elektroporation in die ET-kompetenten Bakterien (s. Kap 2.6.12 und 2.6.13) eingeschleust. Aus mehreren resultierenden Klonen wurde die BAC-DNA isoliert und mit der *EcoRV* Endonuklease gespalten. Die DNA wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und der Bereich mit DNA der Größe um ca. 8 kb wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Dieser Bereich sollte unter anderem das Fragment von Exon 2 bis Mitte des 7. Exon des *Ifngr2*-Gens mit der integrierten Neokassette enthalten. Die DNA wurde eluiert und für eine Ligation mit dem Vektor pBlueskript®SKII, der mit *EcoRV* linearisiert wurde, eingesetzt. Nach der Ligation wurden *E. coli* Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin und Kanamycin selektioniert.

Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA aus den zwei resultierenden Klonen bestätigten, dass in beiden das Genfragment und die darin enthaltene Neokassette in den Vektor pBlueskript®SKII integriert wurde. Dies wurde auch durch Sequenzanalysen bestätigt. Die Plasmid-DNA wurde in Cre exprimierende Bakterien eingeschleust (137), in denen die Neokassette deletiert werden, die *XhoI*-Restriktionsschnittstelle jedoch erhalten bleiben sollte. Von mehreren Klonen wurde die DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau mit *EcoRV* auf die Deletion hin überprüft. Die Plasmid-DNA mit korrekter Deletion wurde für die Integration einer FRT3 -flankierten Neokassette zusammen mit einer zweiten loxP Sequenz eingesetzt. Dazu wurde mit einer PCR ein Fragment erzeugt, das die FRT3-Neokassette, die loxP Sequenz und am 5' und 3' Ende je 50 bp homologe Sequenz zum Zielgen enthielt. Die ET Klonierung wurde durchgeführt wie oben beschrieben. Die Selektion führte zu mehreren

Klonen, die auf die Integration der Neokassette durch einen Restriktionsverdau überprüft wurden (s. Abb. 3.7).



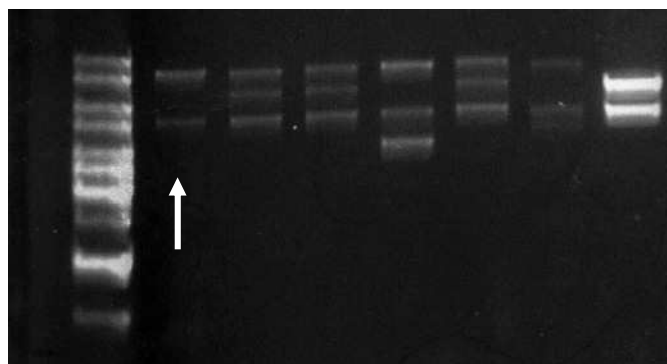
**Abb. 3.7: *XhoI*-Verdau von 10 Klonen nach ET Klonierung.**

*Pfeile markieren die Mischklone mit erwarteter Bandengröße.*

*Ganz rechts ist das ursprüngliche Plasmid aufgetragen*

Abb. 3.7 zeigt die Restriktionsanalyse von 10 Klonen nach ET Rekombination und des ursprünglichen Plasmids. Bei diesem liefert ein *XhoI*- Verdau zwei Banden mit Längen von 5,2 bzw. 6,9 kb. Durch die Integration der Neokassette vergrößert sich die 6,9 kb Bande um 1,6 kb auf ca. 8,5 kb. Alle Klone zeigen noch die ursprüngliche Bande von 6,9 kb. Nur in Klon 4, Klon 5 und Klon 8 stimmt die Größe der obersten Bande mit der erwarteten Größe von 8,5 kb überein. Allerdings liegt in allen drei Klonen das gleiche Verhältnis von ursprünglicher Bande zur Bande mit integrierter Neokassette vor. Klon 1 zeigt keine Veränderung zum ursprünglichen Plasmid, die übrigen Klone weisen eine Bande auf, die größer als die erwartete Bande ist. Um Klone zu erhalten, die nur die veränderte Form des Plasmids enthalten, wurde 1µl einer 1:10 Verdünnung der Plasmid-DNA von Klon 4 erneut in *E. coli* eingeschleust und DNA aus den resultierenden Klonen gewonnen.

Abb. 3.8 zeigt einen Restriktionsverdau von 6 Klonen der Retransformation mit *XhoI*.



**Abb. 3.8: Restriktionsanalyse von Klonen der Retransformation**

*XhoI*-Verdau von Klonen der Retransformation von Klon 4. Rechts ist das ursprüngliche Plasmid (vor der ET Klonierung) aufgetragen.

*Pfeil = Klon4.1*

In Abb. 3.8 ist zu erkennen, dass von 6 Klonen aus der Retransformation nur Klon 4.1 das gewünschte Plasmid mit der integrierten Neokassette ohne eine Verunreinigung durch das

Ursprungsplasmid enthielt. Dieser Klon enthielt damit das vollständige *targeting*-Konstrukt, dass in Abb. 3.9 dargestellt ist.

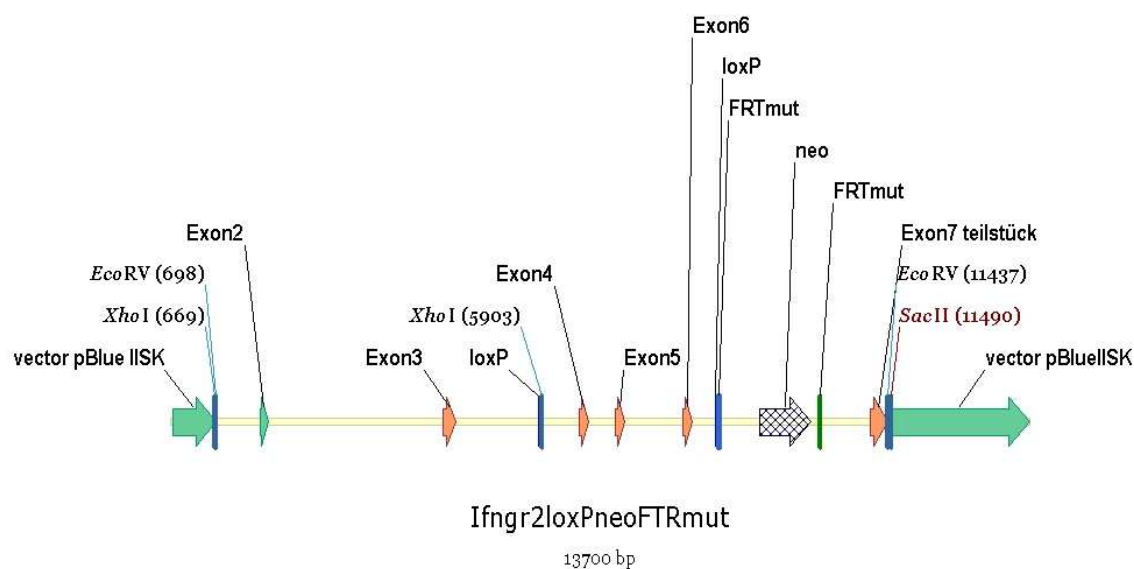


Abb. 3.9: Grafische Darstellung des *targeting*-Konstrukts für das murine *Ifngr2*-Gen.

Die DNA dieses Klons wurde in Cre und Flp exprimierende Bakterien eingeschleust, um die Funktionalität der loxP und frt Sequenzen zu überprüfen (s. Abb. 3.10).

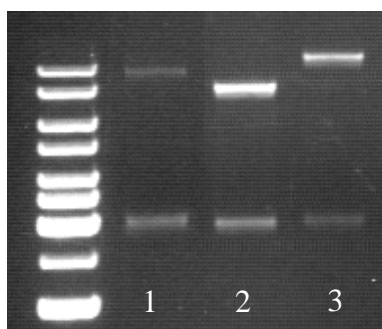


Abb. 3.10: Test auf Funktionalität der loxP undFRT Sequenzen

*EcoRV*-Verdau von Plasmid-DNA nach FLP- und Cre-vermittelter Rekombination.

1 nach Flp-vermittelter Deletion

2 nach Cre-vermittelter Deletion

3 Originalkonstrukt

Die Abbildung 3.10 zeigt *EcoRV*-Spaltungen des Originalkonstrukts vor und nach Cre- und Flp-vermittelter Deletion. Bei der Cre-vermittelten Deletion werden die Exone 4-6 deletiert, so dass die Insertbande um 4,4 kb kleiner wird. Durch die Flp-vermittelte Deletion wird nur die Neokassette entfernt, und die Größe des Inserts nimmt um ca. 1,6 kb ab.

Für den Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen, der Deletion der Neokassette und der Cre-vermittelten Deletion der Exone 4- 6 wurde eine Southern- Blot Strategie entwickelt. Mittels PCR wurden eine 5' und eine 3' Sonde hergestellt, die außerhalb des Konstrukts, aber innerhalb der *XhoI*-Schnittstellen 3' von Exon 1 und 3' von Exon 7 im Wildtyp-Gen liegen. Abb. 3.11 zeigt die Southern-Blot Strategie und welche Signale auf einem Southern-Blot nach der Hybridisierung zu erwarten sind.

Nach homologer Rekombination des *targeting*-Konstrukts in das Genom der ES-Zellen wird nach der Hybridisierung mit der 5' Sonde eine Bande von 8,3 kb erwartet. Die 3' Sonde sollte eine Bande von 6,7 kb liefern. Ohne homologe Rekombination wird beim Wildtyp eine Bande von 15 kb für beide Sonden erwartet. Die Deletion der Neokassette, die in Flp-Deleter Mäusen erfolgen soll, sollte dazu führen, dass die Bande der 3' Sonde sich auf 5 kb verringert, die Bande der 5' Sonde aber unverändert bleibt. Durch Verpaarung der *Ifngr2* flox Mäuse mit transgenen, die Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen sollte die Deletion der Exone 4-6 erfolgen. Durch den Verlust der Exone und der zusätzlichen eingeführten *XhoI* - Schnittstelle wird im Southern-Blot mit beiden Sonden eine Bande bei 10 kb erwartet.

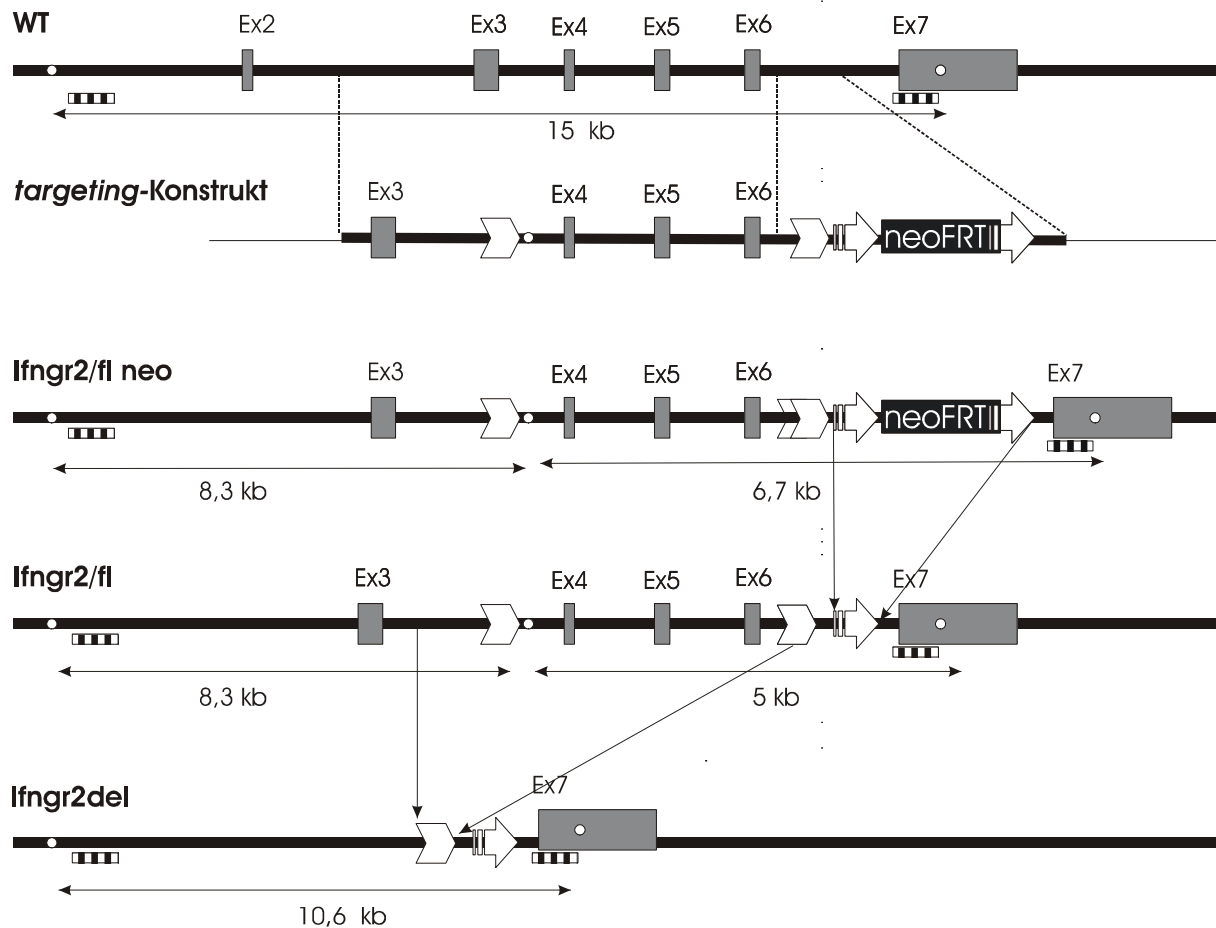
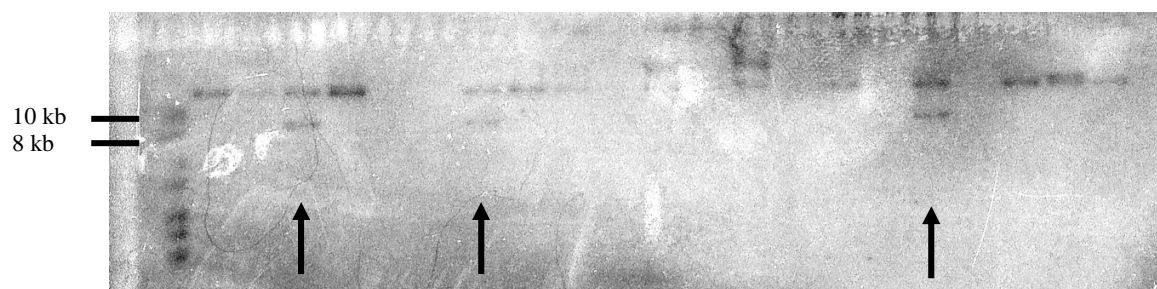


Abb. 3.11: *Ifngr2* targeting-Konstrukt und Southern-Blot Strategie

◁ = loxP; ▷ = FRT3; ○ = *XhoI*-Schnittstellen; ■■■ = Sonden

Das *targeting*-Konstrukt wurde mit *SacII* linearisiert und für eine Transfektion von IDG32 F1 Zellen eingesetzt. Es wurden 600 Klone gepickt, expandiert, Replikate eingefroren und parallel die DNA der Klone analysiert (s. 2.5.2- 2.5.4 und 2.6.3). Dabei stellten sich im Southern-Blot drei Klone als positiv für eine homologe Rekombination heraus (s. Abb.3.12). Diese wurden revitalisiert, und Klon F5 wurde bisher für eine Injektion in C57/Bl6 Blastozysten verwendet. Die Blastozysten wurden in Ammentiere transferiert und die daraus erhaltenen Tiere wurden zur Rückkreuzung mit C57/Bl6-Mäusen eingesetzt. Der nächste Schritt ist nun die Schwanzbiopsie und Analyse der Nachkommen aus den Rückkreuzungen mittels der dargestellten Southern-Blot Strategie. Hiermit soll nun festgestellt werden, ob die genetisch veränderten ES-Zellen an der Entwicklung der Keimbahn beteiligt sind und somit die Mutation an die Nachkommen vererbt werden kann.



**Abb. 3.12: Genomischer Southern der ersten Transfektion**

Die Klone E3, E7 und F5 verfügen über eine Bande in Höhe von 8,3 kb. Dies entspricht der erwarteten Bande bei homologer Rekombination. Die WT-Bande verläuft bei ca. 15 kb.

### 3.2 Erzeugung und Analyse der B-zell-spezifischen Inaktivierung von SRF in Mäusen

SRF ist involviert in verschiedene Prozesse der Zellproliferation und Differenzierung. Eine wichtige Rolle spielt SRF z. B. bei der Differenzierung zu Muskelzellen und der Entwicklung von Neuronen (91-93, 158). Nachdem wir bereits zeigen konnten, dass SRF entscheidend für die Entwicklung von T-Zellen ist (A.Schippers; unveröffentlichte Daten), sollte nun untersucht werden, ob SRF eine ebenso wichtige Rolle in der Entwicklung von B-Zellen spielt, bzw. welche Auswirkungen die Deletion von *Srf* in diesen Zellen hat. Um diese Fragen zu klären, wurden SRF flex1-neo Mäuse (5) mit CD19 Cre-Mäusen verpaart (138). Durch die



Expression der Cre-Rekombinase unter dem B-zell-spezifischen CD19 Promotor sollte *Srf* mit Beginn der CD19-Expression im frühen prä-B-Zellstadium deletiert werden. Abb.3.13 zeigt die Southernstrategie für den Nachweis der konditionalen Mutation und der Cre-vermittelten Deletion.

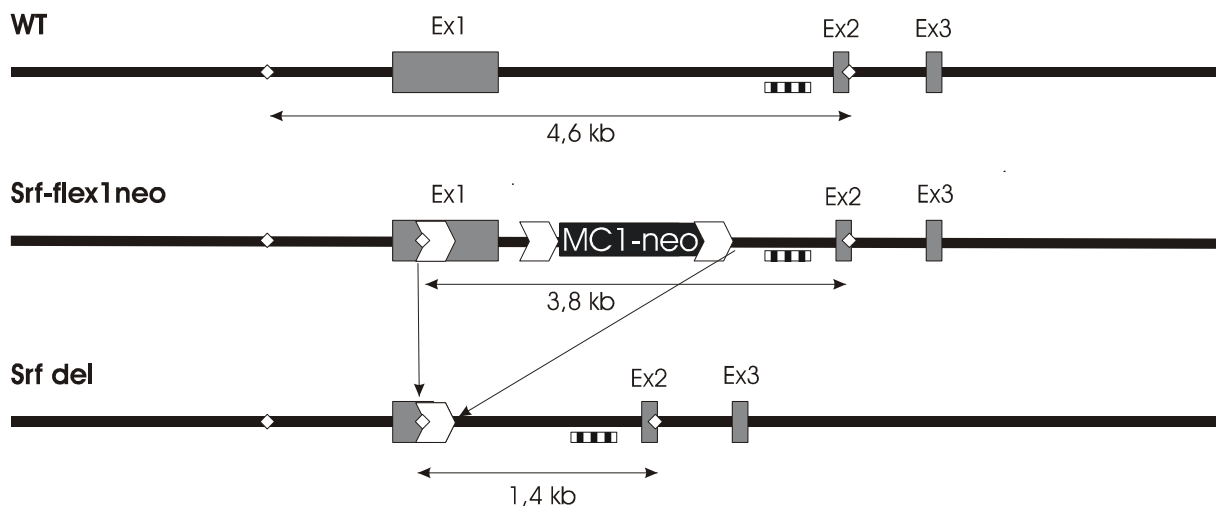
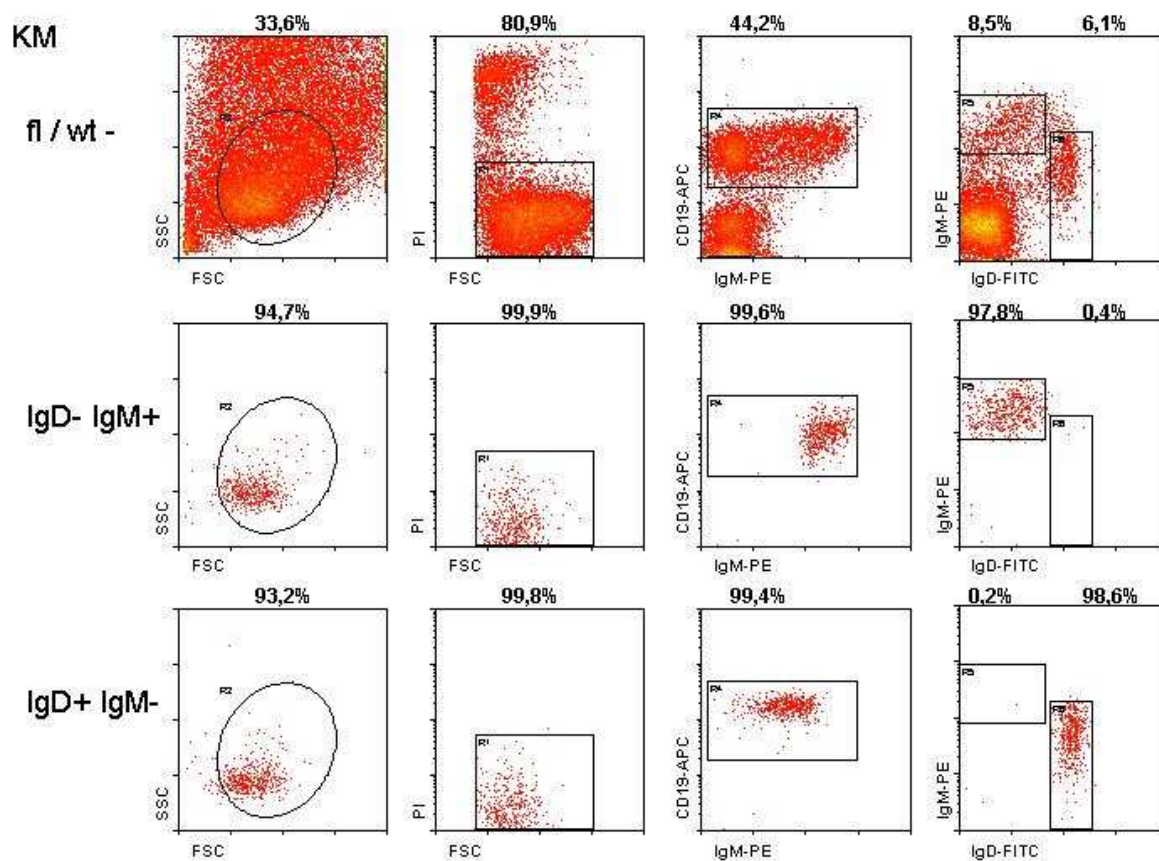


Abb. 3.13: Southern-Strategie zum Nachweis der konditionalen Mutation und der Deletion von *Srf* (nach Wiebel et al. 2001).

$\square$  = loxP;  $\triangleright$  = FRT3;  $\circ$  = EcoRI-Schnittstellen;  $\blacksquare$  = Sonden

### 3.2.1 Deletionsgrad und B-Zellentwicklung in *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/Cre</sup>* Mäusen

Als erstes wurde untersucht, ob und zu welchem Grad die Deletion von *Srf* in den B-Zellen stattfindet. Es wurden dazu Zellen der Milz und des Knochenmarks aus Mäusen mit unterschiedlichen Genotypen isoliert und mit zelltypspezifischen Antikörpern markiert. Anschließend wurden die Zellen der Milz in IgM<sup>+</sup>/ IgD<sup>+</sup> B-Zellen und in T-Zellen und die Zellen des Knochenmarks in IgM<sup>+</sup>/ IgD<sup>-</sup> und IgM<sup>+</sup>/ IgD<sup>+</sup> sortiert. Abb. 3.14 zeigt beispielhaft für alle Sortierungen das Ergebnis einer Sortierung von Knochenmarkszellen einer *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/wt</sup>* Maus und die Reanalyse der sortierten IgM<sup>+</sup>/ IgD<sup>-</sup> und der IgM<sup>+</sup>/ IgD<sup>+</sup> Zellen zum Nachweis des Reinheitsgrades der sortierten Zellen. Um die Effizienz der CD19-Cre-vermittelten Deletion zu bestimmen, wurde die DNA aus den sortierten B- und T-Zellen der Milz und den sortierten B-Zellen des Knochenmarks isoliert, mit *BglII* gespalten und in einem Southern-Blot analysiert (s. Abb. 3.15; zur Southern-Blot Strategie s. Abb. 3.13).



**Abb 3.14: Sortierung von Knochenmarkszellen einer *Srf<sup>fl/wt</sup> CD19<sup>wt/wt</sup>* Maus**

Die erste Reihe zeigt die gates für die Sortierung und die Prozentzahlen der Zellen. Reihe 2 zeigt die Reanalyse der  $\text{IgM}^+/\text{IgD}^-$  Zellen und Reihe 3 die Reanalyse der  $\text{IgM}^+/\text{IgD}^+$  Zellen zur Dokumentation des Reinheitsgrades der sortierten Zellen.

A)

Cre-Expression:

+ - + + - +



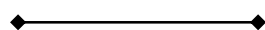
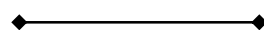
WT-Bande

flox-Bande

delta-Bande

Genotyp:

fl/wt fl/wt fl/fl fl/wt fl/wt fl/fl

B-Zellen  
IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>T-Zellen  
(CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>)

B)

Cre-Expression:

+ + - - + +



WT-Bande

flox-Bande

delta-Bande

Genotyp:

fl/fl fl/wt fl/wt

Abb. 3.15: Southern-Blot Analyse des Deletionsgrad von *Srf*

A) Southern-Blot von B- und T-Zellen der Milz; B) Southern-Blot von IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>Zellen (a) und IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>Zellen (b) des Knochenmarks

Je nach Genotyp und Cre-Expression werden die WT-Bande, die flox-Bande und/ oder die delta-Bande erwartet.

delta-Bande= 1,4kb; flox- Bande= 3,8 kb; Wildtyp-Bande 4,6 kb.

Untersuchungen der Effizienz der CD19-Cre-Rekombinase zeigen, dass in Milzzellen ein Deletionsgrad von 95% erreicht werden kann (122). In Abb. 3.15 A) ist der Southern-Blot von DNA aus B-Zellen und T-Zellen dreier Mäuse mit unterschiedlichen Genotypen abgebildet. Bei den T-Zellen zeigt sich je nach Genotyp eine Wildtyp- und eine flox-Bande bzw. nur eine flox-Bande. Wie erwartet, wird *Srf* in den T-Zellen nicht deletiert, da die Cre-Expression durch den CD19- Promotor B-zell-spezifisch induziert wird, weshalb in T-Zellen keine delta Bande zu beobachten ist. Der Blot beweist damit, dass die Deletion von *Srf* spezifisch in B-Zellen erfolgt. In den B-Zellen werden durch die Expression der Cre-Rekombinase die geflochten Allele deletiert, so dass man bei Zellen aus *Srf*<sup>fl/wt</sup> *CD19*<sup>wt/Cre</sup> Mäusen eine Wildtyp-Bande und eine delta-Bande erhält, bei Zellen aus *Srf*<sup>fl/fl</sup> *CD19*<sup>wt/Cre</sup> Mäusen ist dagegen nur eine delta-Bande zu sehen.

Der Southern-Blot in Abb. 3.15 B) zeigt die Analyse von IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup> und IgM<sup>+</sup>/ IgD<sup>-</sup> Zellen aus dem Knochenmark. Es ist zu erkennen, dass auch in den unreifen B-Zellen eine vollständige Deletion von *Srf* statt findet. Diese Southern-Blot Analysen belegen daher, dass sich B-Zellen ohne funktionales *Srf*-Allel entwickeln können und dass SRF auch für das Überleben der meisten B-Zellen keine essentielle Rolle spielt.

Aufgrund der nahezu vollständigen Deletion von *Srf* in B- Zellen aus *Srf*<sup>fl/fl</sup> *CD19*<sup>wt/Cre</sup> Mäusen werden diese Zellen im folgenden auch als SRF -/- Zellen bezeichnet (s. dazu auch Tabelle 1). Da im Rahmen dieser Arbeit keine Auswirkungen von geflochten *Srf*-Allelen auf den Phänotyp festgestellt wurden, werden B-Zellen mit geflochten *Srf*-Allelen z.T. als Kontrollen eingesetzt und im folgenden auch als SRF Wildtyp-Zellen bzw. SRF +/+ Zellen bezeichnet.

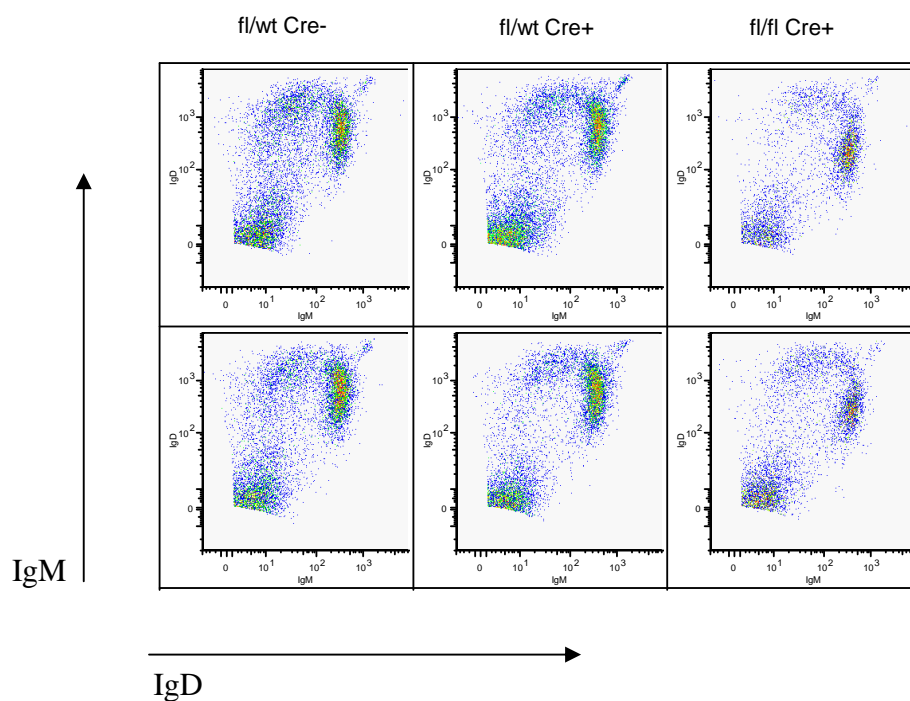
Genotyp der Maus	Synonym für die B-Zellen
<i>Srf</i> <sup>wt/wt</sup> <i>CD19</i> <sup>wt/wt</sup>	SRF Wildtyp oder SRF +/+
<i>Srf</i> <sup>wt/wt</sup> <i>CD19</i> <sup>wt/Cre</sup>	“
<i>Srf</i> <sup>fl/wt</sup> <i>CD19</i> <sup>wt/wt</sup>	“
<i>Srf</i> <sup>fl/wt</sup> <i>CD19</i> <sup>wt/Cre</sup>	SRF +/-
<i>Srf</i> <sup>fl/fl</sup> <i>CD19</i> <sup>wt/wt</sup>	SRF Wildtyp oder SRF +/+
<i>Srf</i> <sup>fl/fl</sup> <i>CD19</i> <sup>wt/Cre</sup>	SRF Knockout oder SRF -/-

Tabelle1:

Bezeichnung der in der Arbeit vorkommenden Genotypen von B-Zellen bezüglich der Deletion von *Srf*

### 3.2.2 Vergleichende Analyse der Expression von IgM und IgD

Die Entwicklung der B-Zellen findet zum größten Teil im Knochenmark statt, wo die Vorläuferzellen der B-Zellen und anderer hämatopoietischen Zellen lokalisiert sind. Im Knochenmark befinden sich daher B-Zellen aller Entwicklungsstadien, von denen sich drei Populationen aufgrund des Expressionsmusters von CD19, IgM und IgD unterscheiden lassen. Die Expression des CD19-Korezeptors beginnt im frühen pro-B-Zell-Stadium, indem auch die Umlagerung des Locus für die schwere Immunglobulinkette beginnt. Die CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> Population des Knochenmarks enthält alle B-Zellstadien von den pro-B-Zellen bis zu den prä-B-Zellen, die das Rearrangement des Locus der schweren Immunglobulinkette abgeschlossen haben und auf ihrer Oberfläche den prä-B-Zell-Rezeptor exprimieren. Dieser besteht aus der schweren  $\mu$ - Kette des IgM und einer Ersatzkette, welche die Stelle der später gebildeten leichten Immunglobulinkette einnimmt. Die abgeschlossene Umlagerung des Locus der leichten Immunglobulinkette kennzeichnet das Stadium der unreifen B-Zellen, die auf ihrer Oberfläche IgM exprimieren. In diesem Stadium verlassen die B-Zellen das Knochenmark und wandern in die Milz, wobei ein Großteil dieser B-Zellen aufgrund von Interaktion des B-Zell-Rezeptors mit Autoantigenen eliminiert wird. Die Zellen, die keine Autoreaktivität zeigen, entwickeln sich zu reifen zirkulierenden B-Zellen, die durch die Expression von IgM und IgD gekennzeichnet sind. Diese reifen B-Zellen zirkulieren mit dem Blutstrom und gelangen so in die peripheren Lymphorgane und auch wieder zurück ins Knochenmark. Anhand von CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus dem Knochenmark sollte untersucht werden, ob sich in *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/Cre</sup>* Mäusen Veränderungen in diesen drei Zellpopulationen feststellen lassen. Dazu wurden zunächst die Zellen des Knochenmarks isoliert und mit anti-CD19-APC, anti-IgM-PE und anti-IgD-FITC gefärbt. In durchflusszytometrischen Analysen wurde dann die Expression von IgM und IgD auf der Oberfläche von CD19<sup>+</sup> positiven Knochenmarks-B-Zellen analysiert (s. Abb. 3.16).

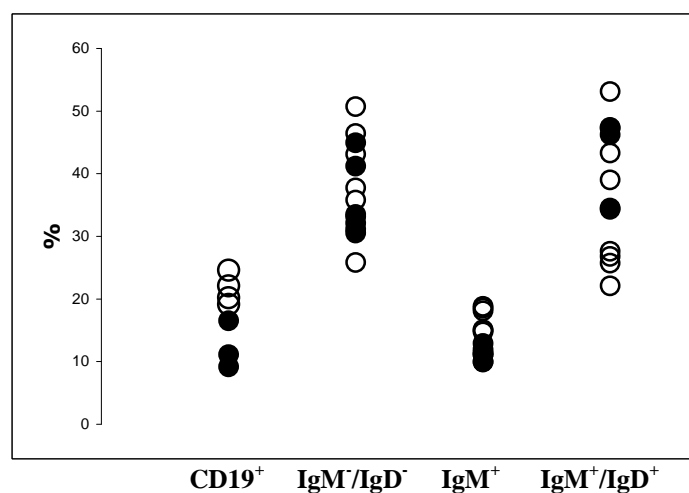


**Abb. 3.16: Expression von IgM und IgD**

Analysiert wurden  $CD19^+$  Zellen des Knochenmarks. Gezeigt sind je zwei Analysen von drei verschiedenen Genotypen

In Abb. 3.16 ist zu sehen, dass bei den verschiedenen Genotypen alle drei im Knochenmark erwarteten B-Zell-Populationen vorhanden sind, SRF also keinen signifikanten Einfluss auf die B-Zell-Entwicklung in einem der untersuchten Stadien hat.

Wie Abb. 3.17 zeigt, lässt sich jedoch bei den  $Srf^{fl/fl}$   $CD19^{wt/cre}$  Mäusen eine allgemeine Reduktion der aller  $CD19^+$  B-Zellen feststellen, die nicht aus der einseitigen Reduktion eines bestimmten B-zell-Stadiums resultiert.



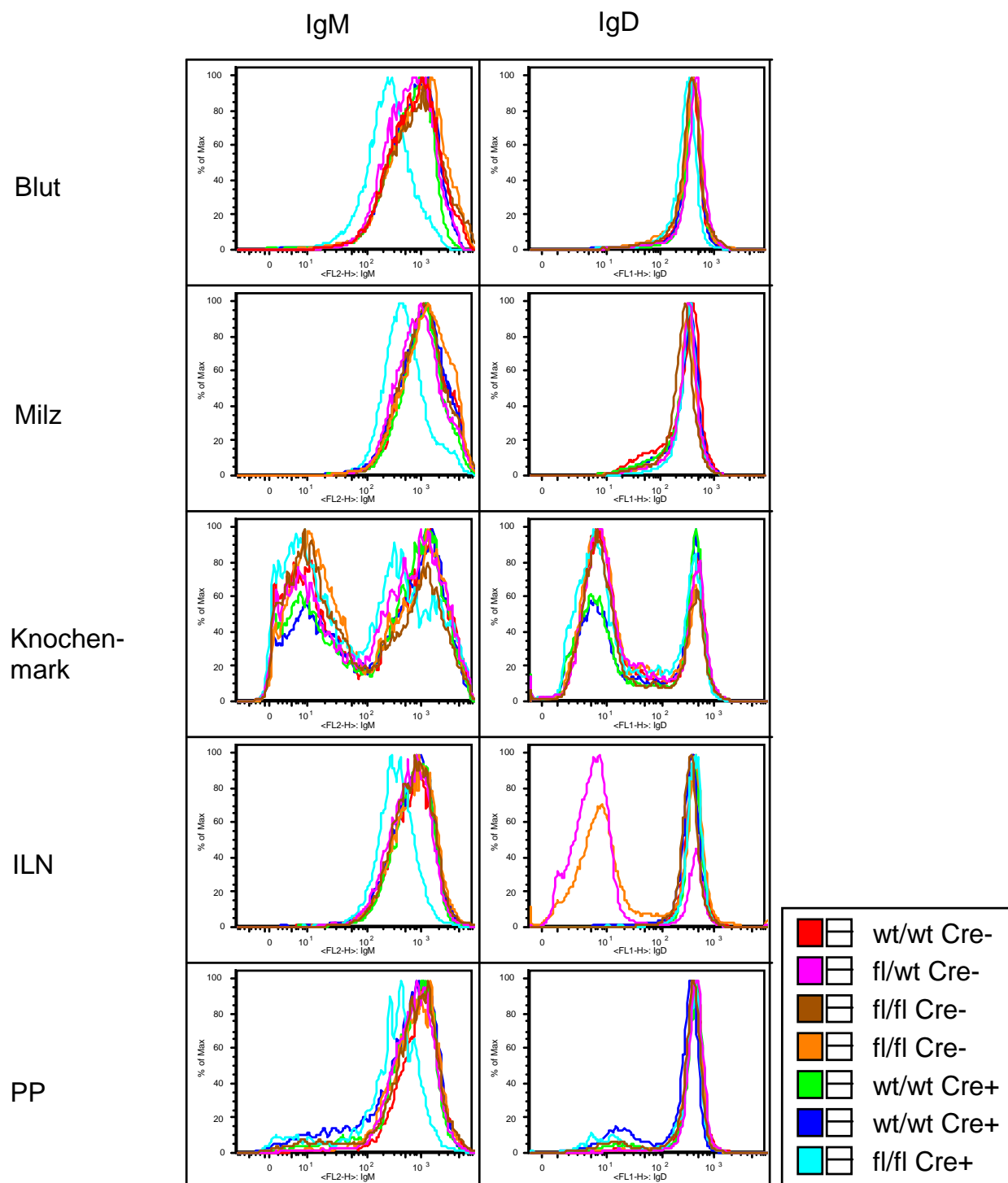
**Abb. 3.17: Verteilung der  $CD19^+$  Zellen auf die drei Entwicklungsstadien**

Die Abb. zeigt den prozentualen Anteil der  $CD19^+$  Population an der Lymphozyten-Population und den Anteil der jeweiligen B-Zell-Population an der  $CD19^+$  Gesamtpopulation

○  $SRF^{+/+}$

●  $SRF^{-/-}$

Die Expression von IgM und IgD wurde in CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus verschiedenen lymphatischen Organen am Durchflusszytometer untersucht (s. Abb. 3.18). Die Färbung der Zellen erfolgte mit anti-CD19-APC, anti-IgM-PE und anti-IgD-FITC.



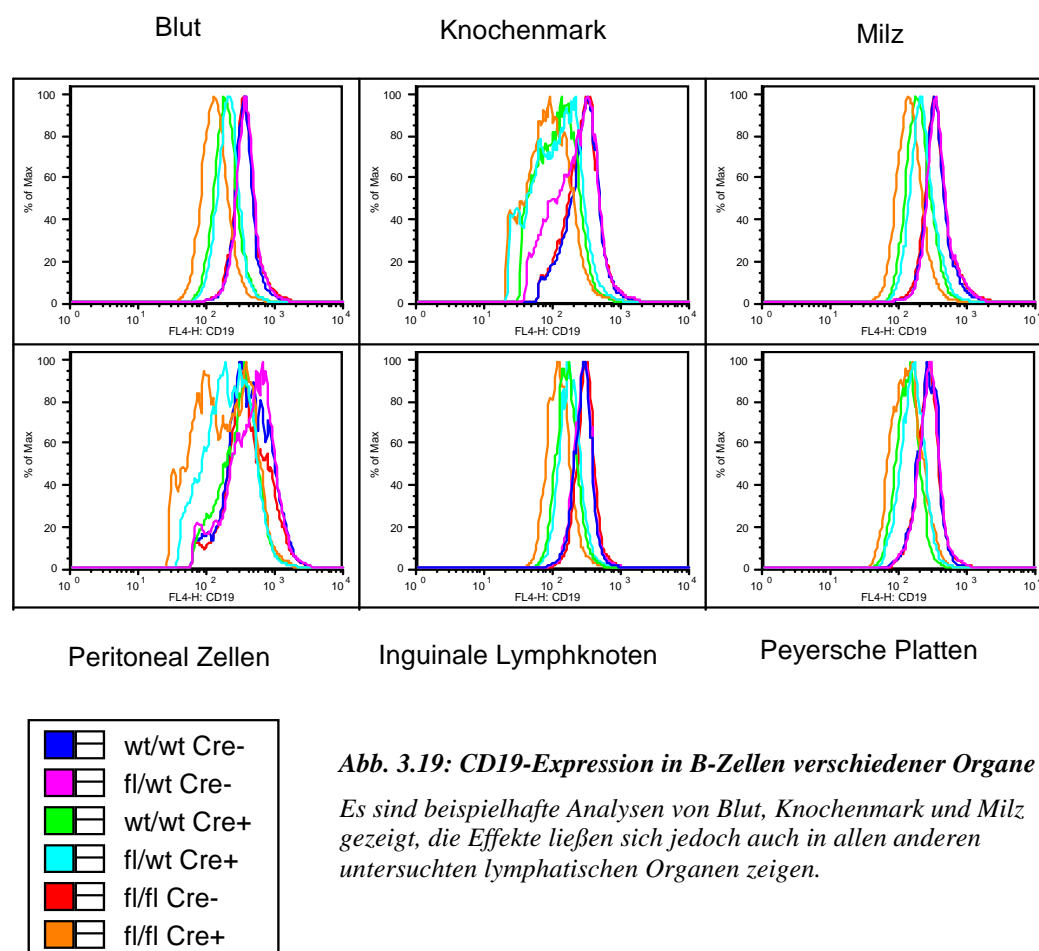
**Abb. 3.18: Analyse der IgM- und IgD-Expression auf CD19<sup>+</sup> Zellen verschiedener Organe und Genotypen**

ILN= inguinale Lymphknoten, PP= Peyersche Platten

Die Analyse zeigt deutlich, dass die Expression von IgM bei Deletion beider Srf-Allele reduziert ist, wohingegen der Verlust nur eines Srf-Allels oder das Fehlen eines CD19 Allels infolge der Expression von CD19-Cre keinen Effekt haben. Im Gegensatz zu IgM wird IgD unverändert auf der Oberfläche der SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen exprimiert. Da IgM und IgD durch alternatives Spleißen aus einem gemeinsamen Primärtranskript hervorgehen, kann allerdings ein Einfluss von SRF auf die Gen-Expression von IgM ausgeschlossen werden. SRF muss daher in einem der Transkription nachgeschalteten Prozesse eine Rolle spielen.

### 3.2.3 Vergleichende Analyse der Expression von CD19

CD19 bildet zusammen mit CD21 und CD81 einen Korezeptorkomplex, der mit dem B-Zell-Rezeptor assoziiert und an der Signalweiterleitung beteiligt ist. CD19 wird exklusiv auf B-Zellen exprimiert, und der CD19-Antikörper diente in allen durchflusszytometrischen Analysen zur Markierung der B-Zellen. Dabei fiel auf, dass die B-Zellen aus Mäusen, die die CD19-Cre Rekombinase exprimieren, aufgrund des *Knockin* in ein CD19-Allel, eine verringerte CD19-Expression aufwiesen. Die genauere Untersuchung der Expression dieses Oberflächenmoleküls auf B-Zellen ergab jedoch, dass die CD19-Expression in SRF-defizienten B-Zellen zusätzlich verringert ist (s. Abb. 3.19).

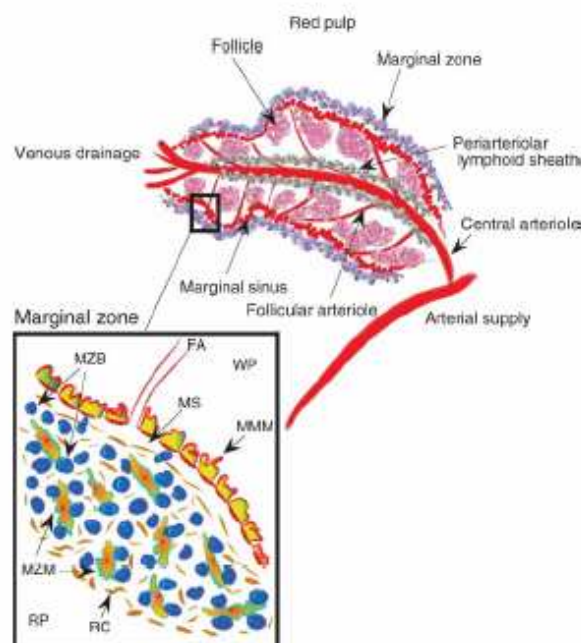




In den in Abb. 3.19 dargestellten Analysen sieht man drei B-Zellfraktionen mit unterschiedlich starker CD19-Expression abhängig vom Genotyp und der Cre-Expression. Alle Zellen, die negativ für CD19-Cre sind und daher über zwei funktionelle CD19-Allele verfügen, zeigen die höchste Expression von CD19. Wildtyp-B-Zellen mit Expression der Cre-Rekombinase und SRF-heterozygote B-Zellen zeigen die gleiche Reduktion in der Expression und die SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen weisen die schwächste Expression von CD19 auf. Die Reduktion der CD19-Expression hängt daher hauptsächlich mit dem Verlust eines CD19-Allels zusammen und der Verlust eines Srf-Allels hat keine weiteren Auswirkungen. Erst wenn beide Srf-Allele deletiert sind, vermindert sich die Expression von CD19 zusätzlich, womit ein gewisser Einfluss von SRF auf die Ausprägung des CD19-Proteins auf der Zelloberfläche festgestellt werden kann.

### 3.2.4 Histologische Untersuchungen

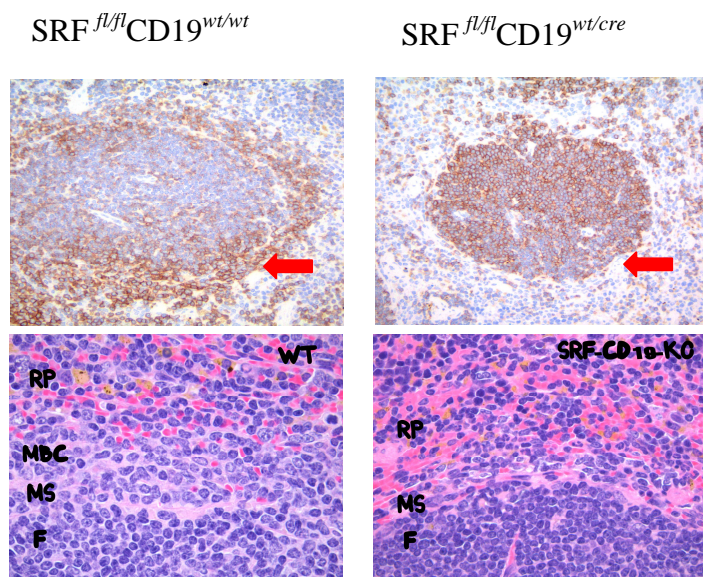
Um zu klären, ob der Verlust von SRF die Anatomie der B-Zell-Follikel in lymphatischen Organen beeinflusst, wurden histologische Untersuchungen an Parafinschnitten von verschiedenen lymphatischen Organen durchgeführt. Die peripheren und mesenterialen Lymphknoten sowie die Peyerschen Platten wiesen keinerlei Veränderungen auf. Die Architektur der Milz zeigte ebenfalls keine Veränderungen in Bezug auf die T-Zell-Zonen und B-Zell-Follikel. Die Färbung mit dem B-Zell Marker B220 ließ jedoch vermuten, dass in den SRF<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>wt/cre</sup> Mäusen die sogenannten Marginalzonen B-Zellen (MZB) fehlen (s. Abb. 3.21 und zum Aufbau der Milz Abb. 3.20).



**Abb. 3.20: Aufbau der Milz**

FA, follikuläre Arteriolen; RC, retikuläre Zellen; RP, rote Pulpa; MS, marginaler Sinus; MMM, Marginalzonen metallophile Makrophagen; MZB, Marginalzonen B-Zellen; MZM, Marginalzonen Makrophagen; WP, weiße Pulpa.

(Pillai et al., 2004)

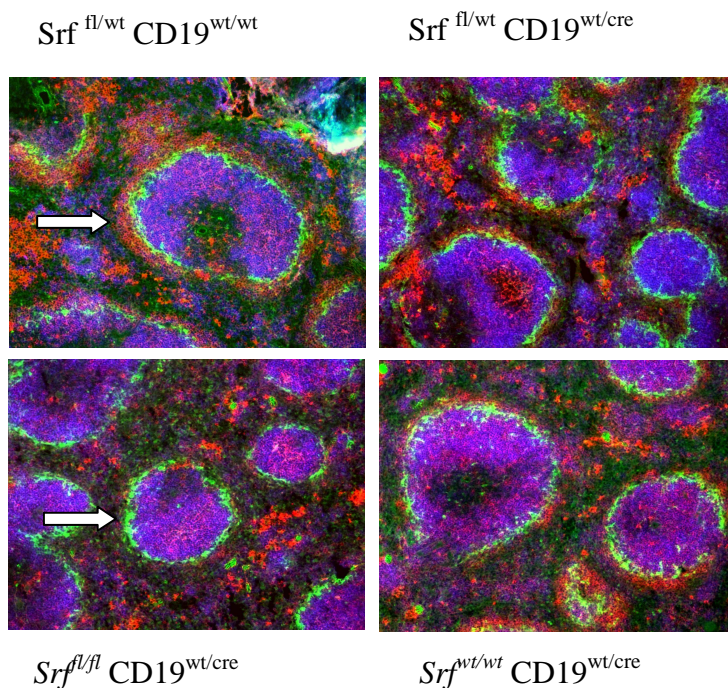


**Abb. 3.21: Histologische Untersuchung der Milz an Parafinschnitten**

oben: Färbung mit anti-B220 (20x Vergrößerung). Die Pfeile weisen auf die Marginalzone.

unten: Hämatoxilin- Eosin-Färbung (40x Vergrößerung). RP, rote Pulpa; MBC, Marginalzonen B zellen; MS, marginaler Sinus; F, Follikel

Diese Vermutung wurde durch Fluoreszenzfärbungen mit den Antikörpern Moma-FITC, anti-IgM-Alexa Fluor™594; und anti-IgD-Alexa Fluor™647 auf Gefrierschnitten der Milz bestätigt (s. Abb. 3.24).



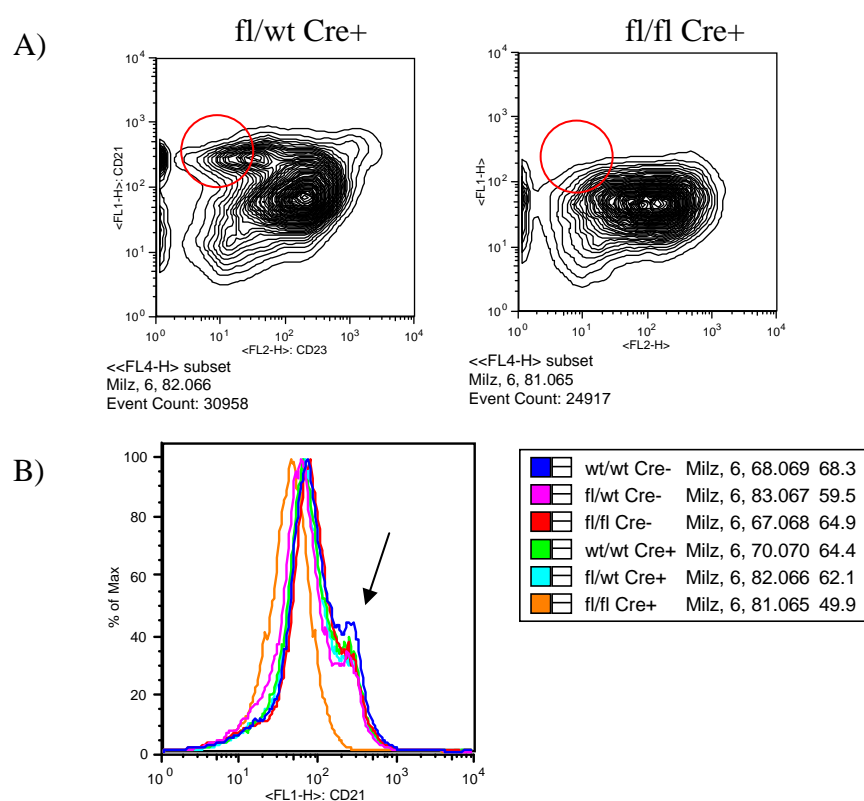
**Abb. 3.22: Fluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten der Milz.**

rot= anti-IgM, grün= Moma (metallophile Makrophagen), blau= anti-IgD.

Die Pfeile bezeichnen die Lage der Marginalzone.

Die Marginalzonen B-Zellen exprimieren IgM aber kein IgD auf der Oberfläche. In den Präparaten von  $Srf^{c wt/wt} CD19^{wt/cre}$ ,  $Srf^{fl/wt} CD19^{wt/wt}$  und  $Srf^{fl/wt} CD19^{wt/cre}$  Mäusen erkennt man diese IgM positive Zellpopulation als roten Ring um die grün gefärbten metallophilen Makrophagen. Nur in der  $Srf^{c fl/fl} CD19^{wt/cre}$  Maus fehlt diese Zellpopulation.

Die MZB lassen sich im Durchflusszytometer aufgrund der Expression verschiedener Oberflächenmarker von follikulären B-Zellen der Milz unterscheiden. Kennzeichnend ist die starke Expression von IgM und CD21 und eine sehr schwache Expression von IgD und CD23. Infolge wurden Milzzellen verschiedener Mäuse isoliert, mit den Antikörpern CD21/35-FITC, CD23-PE, CD19-APC markiert und auf die Expression von CD21 und CD23 untersucht (s. Abb. 3.23).



**Abb. 3.23: Analyse der CD21- und CD23-Expression**

A) Konturplot der CD21/CD23 exprimierenden Zellen. Die Population der  $CD21^{high} CD23^{low}$  Zellen (rot markiert) fehlt in der Mutante (rechts).

B) Expression von CD21 auf  $CD19^+$  B-Zellen der Milz. Die SRF  $-/-$  Zellen zeigen eine deutlich verringerte CD21 Expression. Der Pfeil markiert die Population der MZB mit einer starken Expression von CD21, die in der Mutante fehlt.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt ebenfalls, dass in den  $\text{SRF}^{fl/fl}$   $\text{CD19}^{wt/cre}$  Mäusen die Population der Marginalzonen B-Zellen ( $\text{CD23}^{\text{low}}$   $\text{CD21}^{\text{high}}$ ) als Folge des vollständigen Verlusts von SRF fehlt und bestätigt damit die Befunde der histologischen Untersuchungen an Milzpräparaten. Das Fehlen von SRF führt also zu einem Entwicklungs- oder Überlebensdefekt der MZB. Da in der durchflusszytometrischen Analyse aller B-Zellen der Milz keine Zellen mit hoher CD21-Expression gefunden wurden, handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen Defekt in der Lokalisierung der MZB.

Die beobachteten Effekte sind weder in den  $\text{Srf}^{fl/wt}$   $\text{CD19}^{wt/cre}$  noch in den  $\text{Srf}^{wt/wt}$   $\text{CD19}^{wt/cre}$  vorhanden. Damit ist der Verlust der Marginalzonen B-Zellen unabhängig vom Verlust eines CD19-Allels und tritt nur bei der Deletion beider SRF-Allele auf.

Die Marginalzonen B-Zellen stellen eine spezialisierte Subpopulation der B-Zellen dar, die in der Milz am Marginalsinus lokalisiert sind. An dieser Stelle tritt das Blut aus den follikulären Arteriolen ins Gewebe und durchströmt den Marginalsinus, um sich dann wieder in den ableitenden Venolen zu sammeln (s. Abb.3.20). Dadurch stehen die MZB in ständigem Kontakt mit Blut und den möglicherweise darin enthaltenen Erregern. Sie sind in der Lage, T-Zell-unabhängig innerhalb kürzester Zeit Antikörper zu produzieren und stellen eine frühe Verteidigungslinie der Immunabwehr dar.

### 3.2.5 Analyse der Peritonealzellen

Die B1-Zellen stellen neben den follikulären B-Zellen und den MZB die dritte Population an reifen B-Zellen dar. Sie sind hauptsächlich im Peritoneum und der Pleuralhöhle lokalisiert und besitzen einige phänotypische und funktionelle Ähnlichkeiten mit den MZB. Wie diese weisen die B1-Zellen eine starke IgM-Expression und eine schwache IgD- und CD23-Expression auf, können auf T-Zell-unabhängige Antigene mit einer raschen Produktion von Antikörpern reagieren und zeigen keine somatische Mutation ihrer Immunglobulingene. B1-Zellen sind für den größten Teil des im Blut vorkommenden IgM verantwortlich und tragen auch zur Produktion von IgA bei. Kennzeichnend für B1a-Zellen ist die Expression von CD5 (159).

Um festzustellen, ob auch die Population der B1a-Zellen des Peritoneums durch die Deletion von *Srf* beeinträchtigt ist, wurden Peritonealzellen aus Mäusen mit verschiedenen Genotypen isoliert, mit CD5-Cy, IgM-PE und CD19-APC markiert und am Durchflusszytometer analysiert (s. Abb. 3.24).

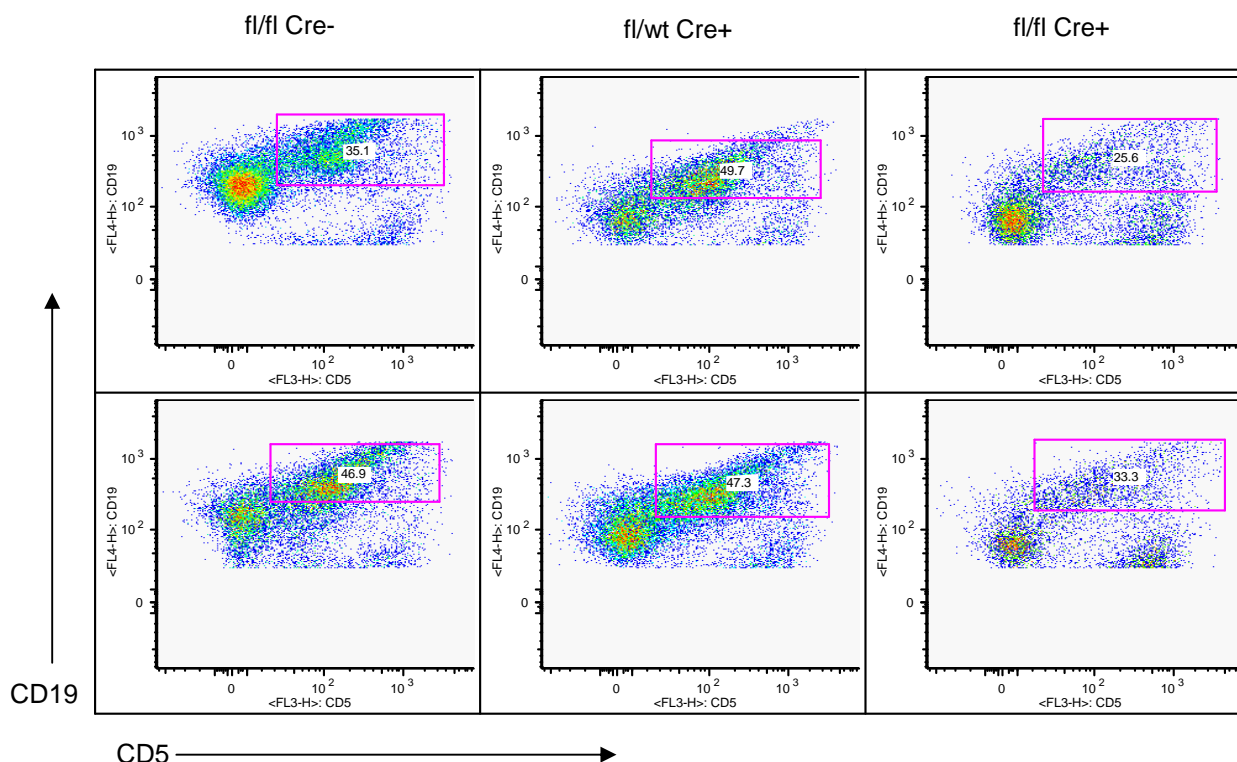


Abb. 3.24: Analyse der peritonealen B-Zellen

Gezeigt sind die Analysen von jeweils zwei Mäusen pro Genotyp.

Wie die Abb. 3.24 zeigt, ist die Population der CD5-exprimierenden B1a-Zellen in den  $Srf^{fl/fl}$   $CD19^{wt/cre}$  Mäusen zwar vorhanden, doch sie ist deutlich reduziert. Ob die fehlende Expression von SRF tatsächlich einen Einfluss auf Entwicklung, Überleben oder Lokalisation der B1-Zellen hat, muss jedoch durch eine Southern-Blot Analyse dieser Zellen überprüft werden, um auszuschließen, dass die vorhandenen B1-Zellen der Deletion von SRF entkommen sind.



### 3.2.6 Messung der basalen Immunglobulinkonzentration im Blutserum

Die wichtigste Funktion von B-Zellen in der Immunabwehr ist die Sezernierung von Antikörpern. Eine Analyse von Blutserum sollte daher einen ersten Überblick liefern, ob der Verlust der SRF-Expression die Zusammensetzung des Antikörperspiegels im Serum beeinträchtigt. Hierzu wurde das Serum verschiedener Mäuse mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (s. 2.8.12) im Durchflusszytometer analysiert (s. Abb. 3.25). Die Werte für die IgE-Konzentration lagen unter der Nachweisgrenze und sind daher nicht aufgeführt.

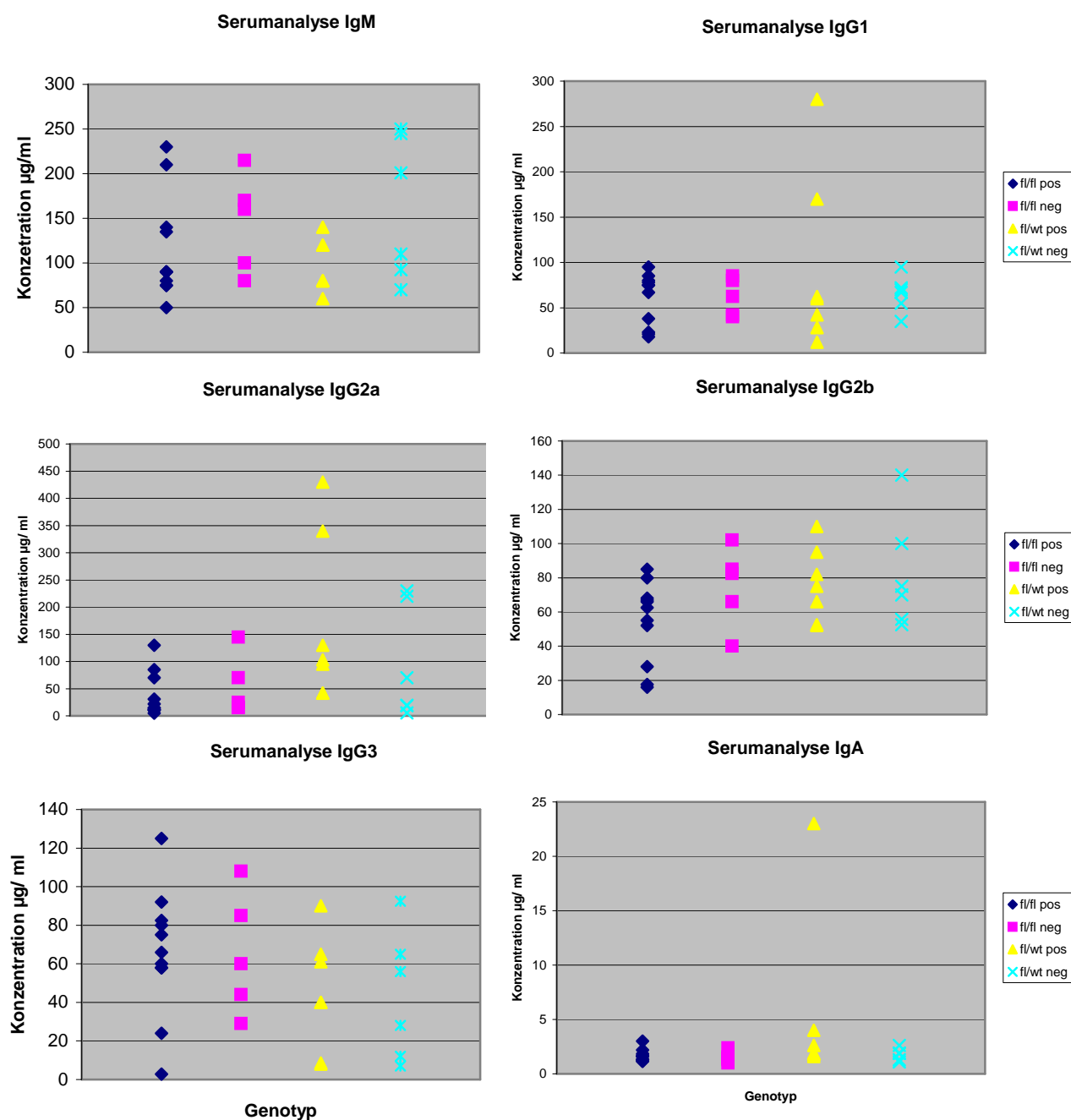
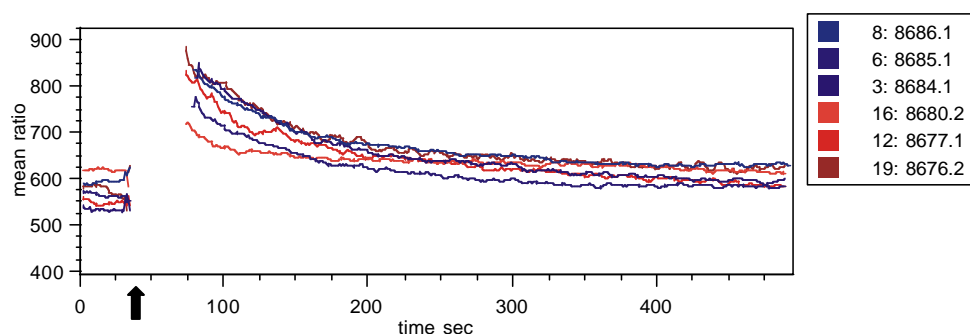


Abb. 3.25 Serumanalyse

Die Analyse des Blutserums zeigte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Der Verlust von SRF hat scheinbar zumindest bei Mäusen im gesunden Zustand keine Auswirkung auf die Antikörperproduktion. Da jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Antikörper von Plasmazellen gebildet werden, in denen keine Deletion von *Srf* stattgefunden hat, lässt sich nur aufgrund dieser Untersuchung keine abschließende Aussage über eine Funktion von SRF in der Produktion und Sezernierung von Antikörpern machen.

### 3.2.7 Kalzium-Mobilisierung

Um zu überprüfen, ob die geringere Dichte von IgM auf der Zelloberfläche von *Srf*<sup>-/-</sup> B-Zellen einen funktionellen Effekt zeigt oder die Signalweiterleitung vom B-Zell-Rezeptor in diesen Zellen beeinträchtigt ist, wurde der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nach Stimulierung des B-Zell-Rezeptors durch anti-IgM  $\text{F(ab')}_2$  gemessen. Dazu wurden Milz-Zellen von verschiedenen Mäusen unterschiedlicher Genotypen mit Indo-1 und anti-CD19-APC gefärbt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im unstimulierten Zustand am Durchflusszytometer bestimmt. Die Zugabe des Antikörpers bewirkt eine Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird, die unter anderem den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins Zytoplasma zur Folge hat. Die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration verschiebt das Emissionsmaximum von Indo-1, was am Durchflusszytometer gemessen wurde (s. Abb.3.26).



**Abb. 3.26: Messung der Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von anti-IgM, wofür die Messung kurzzeitig unterbrochen wird

rot=*SRF*<sup>-/-</sup> blau = *SRF*<sup>+/+</sup>

Wie in Abb. 3.26 deutlich wird, bewirkt die Stimulierung des BCR einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins Zytoplasma, jedoch hat der Verlust von *Srf* und die beobachtete Reduktion der IgM Expression keinerlei Auswirkung, da sich alle Zellen gleich verhalten. Es kann also davon

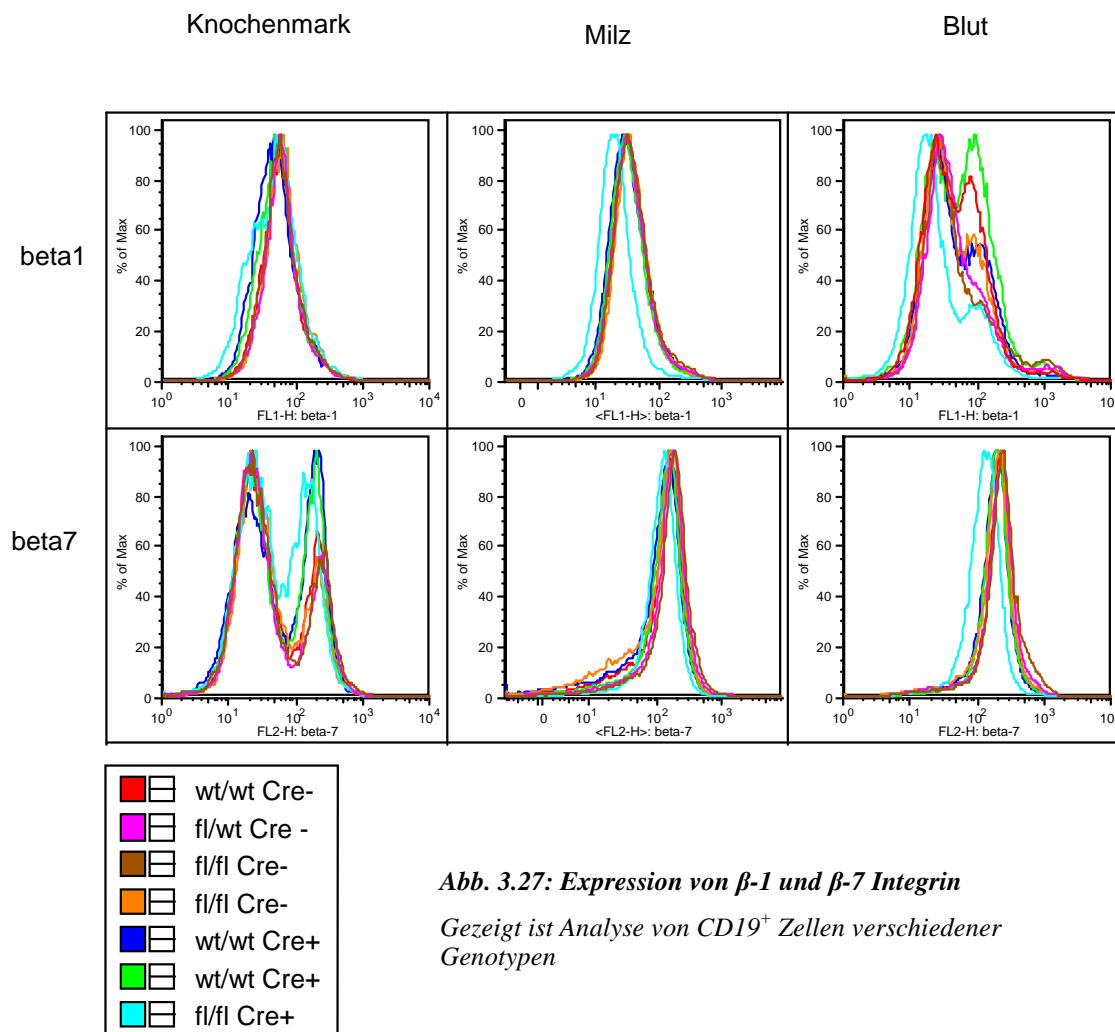
ausgegangen werden, dass die Signaltransduktion, die über IgM zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen führt, nicht von SRF abhängig ist. Ebenso lieferte dieser Versuch keinen Hinweis auf eine verminderte Aktivierbarkeit der B-Zellen als Folge der geringeren Menge an IgM auf der Oberfläche. Allerdings lassen sich aus diesen Ergebnissen noch keine Rückschlüsse über mögliche Defekte der B-Zell-Funktionen *in vivo* ableiten.

### 3.2.8 Vergleichende Analyse der Expression von $\beta_1$ - und $\beta_7$ - Integrin

SRF ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für Gene des Aktinzytoskeletts und die Srf-Aktivität wird über die Rho-abhängige Polymerisation von F-Aktin über den Kofaktor MAL reguliert (87). Die Untersuchung von SRF defizienten ES-Zellen und Neuronen zeigten, dass durch den Verlust von SRF das Aktinzytoskelett desorganisiert ist, was zu Defekten in der Adhäsion und Migration dieser Zellen führt (160).

Integrine sind heterodimere, Zellmembran-gebundene Moleküle, die aus einer  $\beta$ - und einer  $\alpha$ -Untereinheit bestehen und Kontakte zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix bilden. Sie sind in die Adhäsions- und Migrationsprozesse von Lymphozyten involviert und vermitteln über ihre Interaktion mit dem Aktinzytoskelett sowohl Signale von außen ins Innere der Zelle als auch umgekehrt. Daher sollte untersucht werden, ob in B-Zellen ein Zusammenhang zwischen SRF und Expression von  $\beta_1$ - und  $\beta_7$ - Integrinen bestehen.  $\beta_1$ -Integrine, deren  $\beta_1$ -Untereinheit mit vielen der versch.  $\alpha$ -Untereinheiten dimerisieren kann, können auf B- und T-Lymphozyten sowie anderen nicht lymphoiden Zelltypen vorkommen. Die Gruppe der  $\beta_7$ -Integrine, die nur aus  $\alpha_4\beta_7$  und  $\alpha_E\beta_7$  besteht, wird ausschließlich von Leukozyten exprimiert, dabei vor allem von Lymphozyten im Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebe in Darm und Bronchien (161).  $\beta_7$ - Integrine spielen eine wichtige Rolle beim sog. *homing* dieser Lymphozyten in die Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (162). Für die Analyse der Integrin-Expression wurden Zellen aus verschiedenen Geweben mit den Antikörpern  $\beta_7$ -PE,  $\beta_1$ -FITC, CD19-APC, CD4-Cy und CD8-Cy markiert und im Durchflusszytometer analysiert (s. Abb. 3.27).





**Abb. 3.27: Expression von  $\beta$ -1 und  $\beta$ -7 Integrin**

Gezeigt ist Analyse von  $CD19^+$  Zellen verschiedener Genotypen

In den meisten Untersuchungen zeigen die SRF $^{-/-}$  B-Zellen eine abgeschwächte Expression von  $\beta_1$ - und/ oder  $\beta_7$ -Integrin. Die Effekte schwanken allerdings zwischen den einzelnen Analysen, so dass hier keine zutreffende Aussage über den Einfluss von SRF auf die Ausprägung dieser Adhäsionsmoleküle gemacht werden kann.

### 3.2.9 Analyse der Genexpression in B-Zellen mittels RNA-Arrays

Da es sich bei SRF um einen Transkriptionsfaktor handelt, sollte die Frage geklärt werden, welche Gene in B-Zellen durch den Verlust von SRF differenziell reguliert werden und ob es darunter B-zell-spezifische Gene gibt. Hierzu wurden drei Chip-Analysen durchgeführt.

Die Zellen aus Milz und Knochenmark wurden isoliert und die Zellen von jeweils zwei Mäusen gleichen Genotyps wurden gepoolt. Aufgrund der Expression von IgM und IgD wurden die Zellen in die Populationen der unreifen B-Zellen ( $IgM^+ IgD^-$ ) und reifen B-Zellen ( $IgM^+ IgD^+$ ) am FACS MoFlo sortiert. Eine solche Sortierung ist in Abb. 3.28 beispielhaft

dargestellt. Die Reanalyse der sortierten Zellen, die den Reinheitsgrad der Zellen dokumentiert, ist in Abb. 3.29 dargestellt. Mindestens 100000 Zellen jeder Population wurden in RT-Puffer aufgenommen und die RNA-Isolierung und Durchführung der Arrays erfolgte in der Array Facility der GBF.

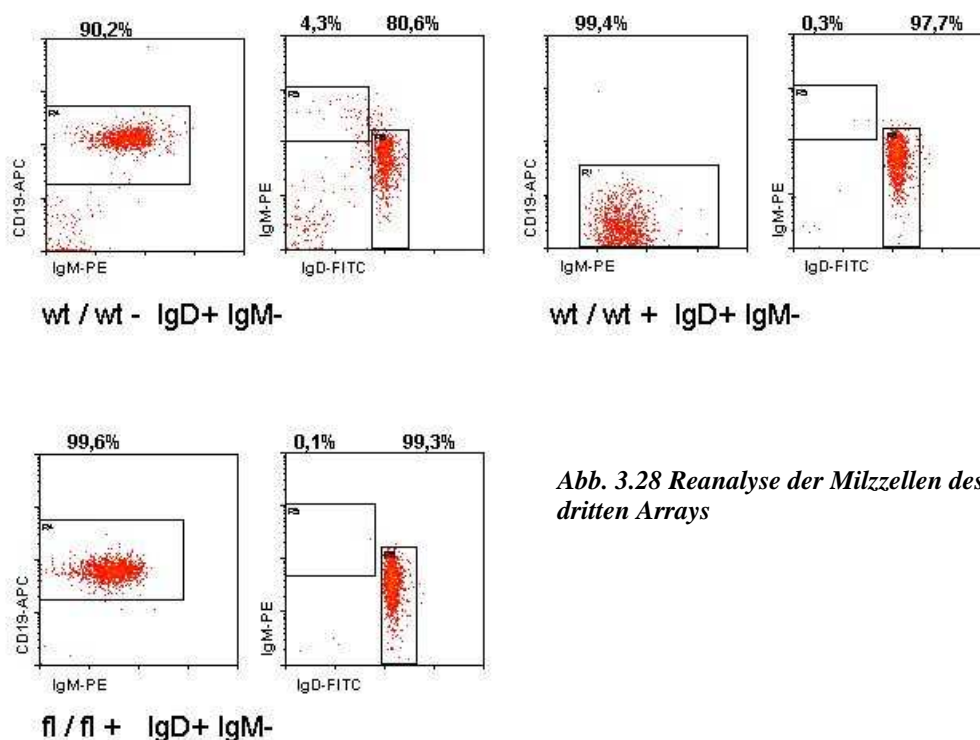


Abb. 3.28 Reanalyse der Milzzellen des dritten Arrays

Tabelle 2 zeigt die ausgewählten Ergebnisse von drei unabhängigen Analysen. Wie erwartet, wurden die *immediate early genes* *srf*, *c-fos* und *junB*, und einige Gene des Zytoskeletts (*actin-g*, *actin-b*, *vinculin*, *vimentin*) in den *Srf*<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich schwächer exprimiert. Des weiteren enthält die Tabelle die B-zell-spezifischen Gene *Iga* (CD79a) und *Igb* (CD79b) und verschiedene Lymphozyten-spezifische Gene (ICAM-2, CXCR4), deren Transkription durch das Fehlen von SRF beeinträchtigt ist. In der rechten Spalte ist außerdem aufgeführt, welche der Gene auch durch den Verlust eines CD19-Allels beeinflusst werden. Diese Daten stammen aus einem Vergleich der Array-Daten von SRF-Wildtyp-Zellen mit und ohne CD19-Cre-Expression.

Gen	1. Array	2. Array		3. Array	CD19-Effekt
		1. Milz	2. KM		
SRF	-1,77	-2,46	-2,64	-2,38	ja
CD19	NP	-1,6	-1,66	-1,0	ja
c-fos /fos	-3,27	-3,38	-1,86	-1,65	nein
junB	-1,95	-1,3	+1,52	+1,62	nein
egr-1	-7,4	- ,37	-1,75	NC	nein
CD22	-2,23	-1,1NC	+1,3	+1,9	nein
CXCR4	-1,89	-2,14	-2,3	-1,09	nein
ICAM-2	-3,25	+1,1 NC	+3,25	+2,11	nein
CD79a	-1,5	-1,24	+1,9	-1,75	nein
CD79b	-1,47	-1,22	NC	-1,1 NC	nein
CD48	-2,81	-1,12	-1,89	-1,1 NC	ja
CD37	-1,94	-1,45	NC	+1,4	ja
CD24a	-2,2	-1,25	-1,37	-1,15	nein
fcgr2b	-1,69	-1,3	-1,6	-1,45	nein
Il-2 recetor gamma chain	NC	+1,4	+1,62	+1,11	ja
Il-6 signal transducer chain (gp130)	NP	-1,48	+1,1	-10,48	nein
actin beta	-3,29	-1,67	-1,94	-1,36	nein
actin gamma	NP	-4,86	-5,94	NP	nein
vinculin	NP	-1,34	-1,4	+1,32	nein
vimentin	-1,9	NC	-1,68	-1,67	nein
bcl-2	NP	NC	+1,4	-1,17	ja
cyclin D2 (Ccnd2)	NP	NC	-1,41	- 1,89	nein

**Tabelle 2: RNA-Arrays von IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> Zellen aus Milz und Knochenmark**

Verglichen wurden in den Arrays SRF<sup>+/+</sup> Zellen mit SRF<sup>-/-</sup> Zellen. Die Werte geben die x-fache Veränderung der Genexpression vom Wildtyp zur Mutante an. <sup>+</sup> = verstärkte Expression in der Mutante; <sup>-</sup> = verringerte Expression in der Mutante; NP= not present, kein Signal erhalten; NC= no change, keine signifikante Veränderung.

Gezeigt sind ausgewählte Ergebnisse aus drei unabhängigen RNA-Arrays (1-3). Im 2. Array wurden Milz und Knochenmarkszellen eingesetzt. Daraus ergaben sich zwei unabhängige Datensätze (Milz und KM)

Im dritten Array wurde zusätzlich verglichen zwischen wt CD19-Cre negativen und wt CD19-Cre positiven Zellen, um den Einfluß von CD19-Cre auf die Genexpression zu untersuchen. ja= Gen ist durch CD19 in seiner Expression beeinflusst; nein= CD19 hat keinen Einfluss auf die Genexpression

Für die Lymphozyten-spezifischen Gene CD22, CD48, ICAM-2 und CXCR4 (s. Tabelle 1) konnte im ersten Array eine Veränderung der Expression bei Verlust von SRF festgestellt werden. Es sollte daraufhin untersucht werden, ob die Expression auch auf Proteinebene verändert ist. Mit den zwei nachfolgenden Arrays, die aufgrund der hohen Auslastung der Array-facility erst im Abstand von jeweils ca. 6 Monaten durchgeführt werden konnten, ließen sich einige der Daten des ersten Arrays reproduzieren, wie z.B. die verminderte Expression von *c-fos*, *egr-1* und *actin-beta*, andere Daten zeigen dagegen große Schwankungen zwischen den verschiedenen Arrays, wie z.B. *Cd22*, *icam-2* und *vinculin*.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen von Genen aufgeführt, die aufgrund des ersten Arrays als differentiell reguliert angesehen wurden. Dazu wurden Zellen aus verschiedenen lymphatischen Organen oder aus dem Blut isoliert, mit den entsprechenden Antikörpern markiert und am Durchflusszytometer analysiert.

#### **3.2.10 Vergleichende Analyse der Expression von CD22**

Im ersten RNA-Array wurde eine verringerte Expression des CD22 Gens in SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen beobachtet. CD22 ist ein akzessorisches Molekül, das als negativer Regulator des B-Zellrezeptors fungiert (163, 164).

Da CD22-defiziente Mäuse auch einen Verlust der MZB zeigen, sollte geklärt werden, ob der in SRF defizienten Mäusen beobachtete Verlust der MZB mit einer reduzierten CD22-Expression zusammenhängt (165). Abb. 3.29 zeigt eine durchflusszytometrische Analyse der CD22-Expression in Zellen des Knochenmarks, der Milz und des Peritoneums.

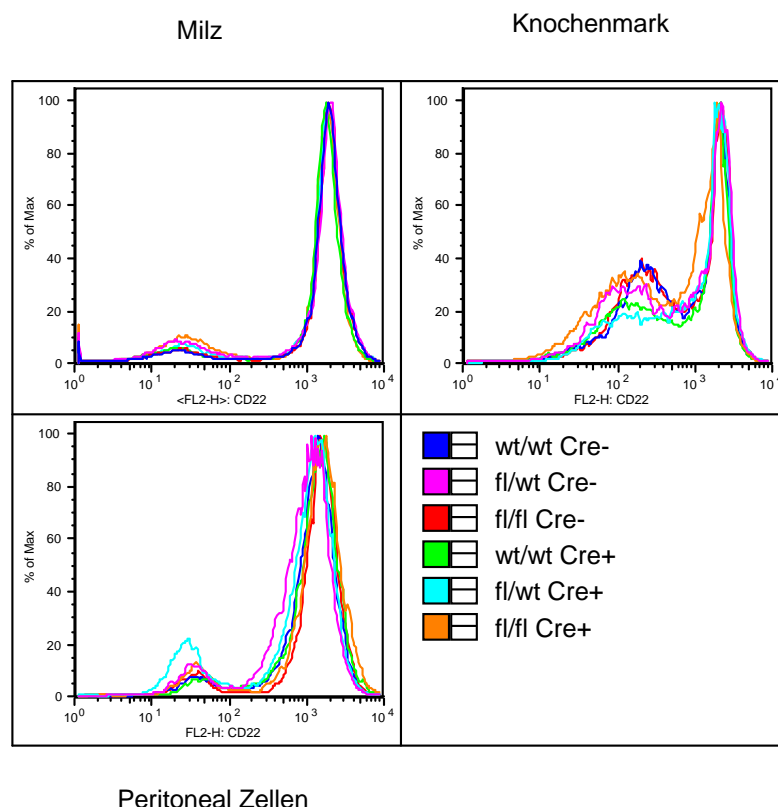


Abb. 3.29: Expression von CD22

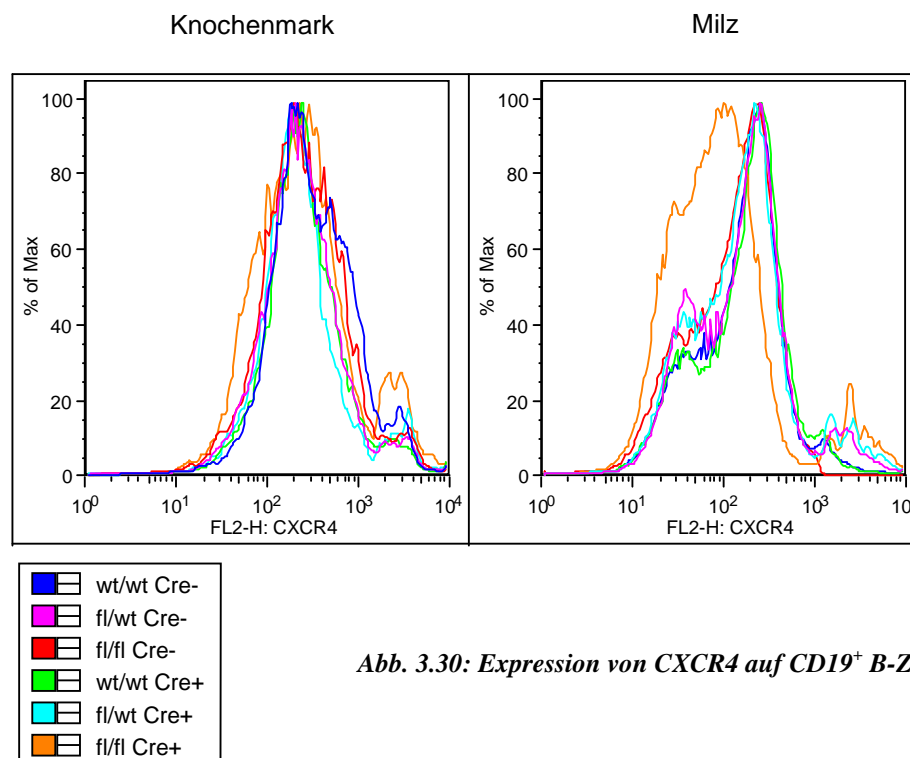
Die Analyse zeigt, dass die Deletion von *Srf* keinen Effekt auf die Proteinexpression von CD22 hat. Der auf RNA-Ebene beobachtete Effekt korreliert also nicht mit der Expression des Proteins. Ein Zusammenhang von SRF-vermittelter CD22-Expression und Verlust der MZB kann daher ebenfalls ausgeschlossen werden.

### 3.2.11 Vergleichende Analyse der CXCR4-Expression

Die Expression von CXCR4 auf B-Zellen sollte aufgrund der im ersten Array beobachteten verminderten Genexpression in SRF<sup>-/-</sup> Zellen durch eine Färbung mit dem entsprechenden Antikörper im Durchflusszytometer analysiert werden.

Bei dem Molekül CXCR4 handelt es sich um den Rezeptor für das Chemokin CXCL12 (SDF-1). Er wird auf B- und T-Zellen exprimiert und ist u.a. für die Retention der unreifen B-Zellen im Knochenmark und damit für die Entwicklung reifer B-Zellen wichtig (166). Mäuse mit einem B-zell-spezifischen Knockout für CXCR4 zeigen eine reduzierte Anzahl an MZB und B1-Zellen (167).

Abb. 3.30 zeigt beispielhaft die Analyse der CXCR4-Expression von B-Zellen aus Milz und Knochenmark. Die Zellen wurden mit CXCR4-Bio + Sekundärantikörper Streptavidin-PE, CD4-Cy, CD8-FITC und CD19-APC gefärbt.

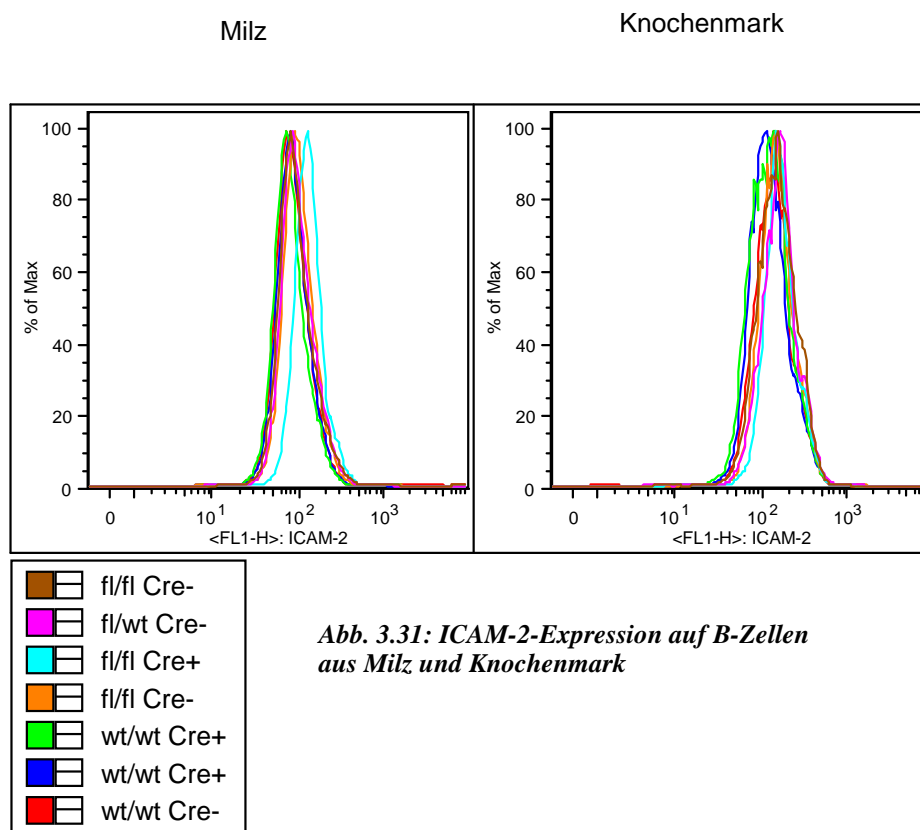
Abb. 3.30: Expression von CXCR4 auf CD19<sup>+</sup> B-Zellen

Die Expression von CXCR4 ist auf den SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen der Milz deutlich verringert, verglichen mit den Zellen der anderen Genotypen. Das Fehlen der beiden Srf-Allele führt also zu einer verminderten Ausprägung von CXCR4 auf der Zelloberfläche, während der Verlust eines CD19-Allels und das Fehlen nur eines Srf-Allels keinen Effekt haben. Im Knochenmark dagegen sieht man nur einen sehr geringen Effekt durch den Verlust von SRF. Die schwächere Expression von CXCR4 in reifen B-Zellen der Milz wird auch in allen drei RNA-Arrays beobachtet. Die Tabelle 2 zeigt außerdem, dass die reifen B-Zellen im Knochenmark ebenfalls eine geringere CXCR4 Expression zeigen. In den durchflusszytometrischen Analysen wird dieser Effekt wahrscheinlich durch B-Zellen in frühen Entwicklungsstadien, die in der CD19<sup>+</sup> Population des Knochenmarks enthalten sind überlagert.

### 3.2.12 Vergleichende Analyse der ICAM-2-Expression

Im ersten RNA-Array wurde eine verringerte Expression von ICAM-2 (*intercellular adhesion molecule-2*) in SRF defizienten B-Zellen beobachtet (s. Tabelle 2). ICAM-2 gehört strukturell zur Immunglobulin-Superfamilie und wird schwach auf fast allen Leukozyten einschließlich T- und B-Zellen exprimiert (168, 169). ICAM-2 interagiert mit LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen-1*), dass auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird und kann in B-Zellen durch

Interaktion mit seinem Liganden eine Signalkaskade aktivieren, die B-Zellen vor Apoptose schützt (170). In Abb. 3.31 ist die Expressionsanalyse dieses Oberflächenmoleküls dargestellt.



*Abb. 3.31: ICAM-2-Expression auf B-Zellen aus Milz und Knochenmark*

Die ICAM-2-Expression ist in den SRF  $-/-$  B-Zellen der Milz leicht erhöht, während dies im Knochenmark nicht zu beobachten ist. Diese Analyse widerspricht damit den Daten des ersten RNA-Arrays, der eine Reduktion von ICAM-2 Transkripten in SRF  $-/-$  B-Zellen zeigte. Die folgenden zwei Arrays dagegen unterstützen die hier gezeigten Daten, da sie eine stärkere ICAM-2-Expression in SRF $-/-$  B-Zellen zeigen (s. Tabelle 2). Der Einfluss von SRF auf ICAM-2 ist daher nicht eindeutig zu klären.

### 3.2.13 Vergleichende Analyse der CD48-Expression

CD48 ist ein weiteres lymphozytenspezifisches Oberflächenprotein, dessen Expression aufgrund der Daten des ersten Arrays mit einer Antikörperfärbung untersucht wurde.

CD48 und sein Ligand CD2 sind involviert in Adhäsionsprozesse und Regulation der Apoptose (151, 171, 172). Abb. 3.32 zeigt die durchflusszytometrische Analyse von Blut, Knochenmark und Milz.

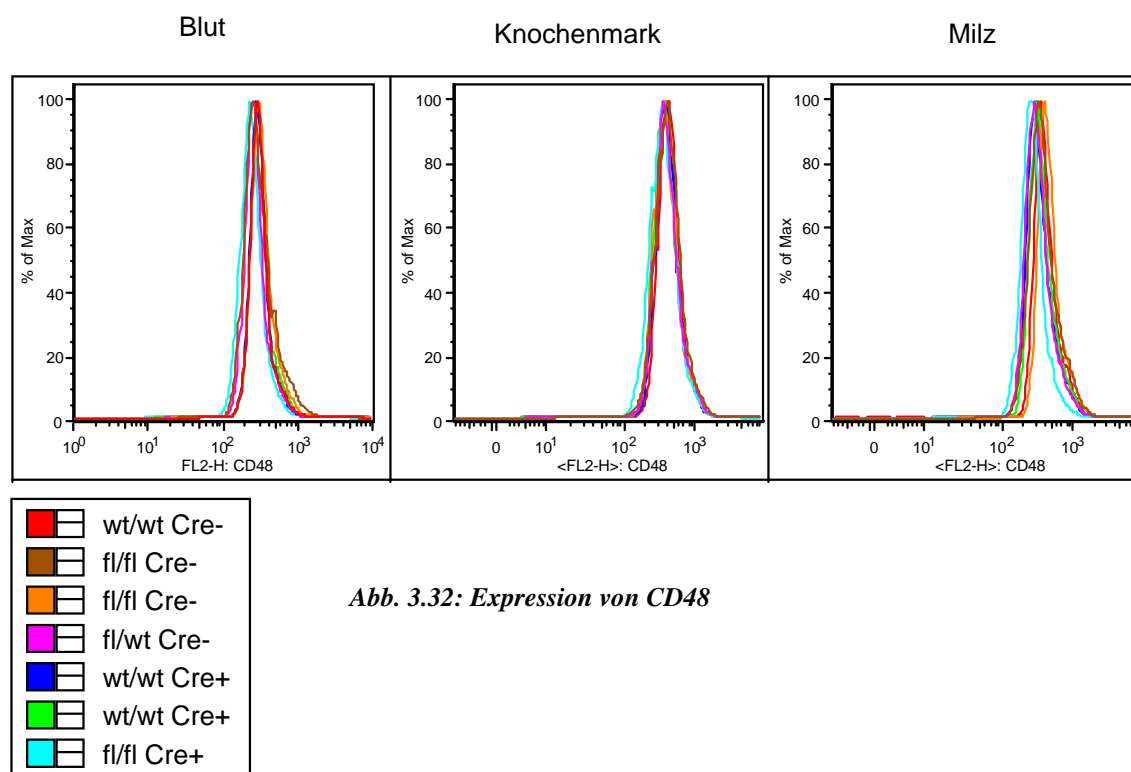


Abb. 3.32: Expression von CD48

Die Analysen am Durchflusszytometer zeigten mehrheitlich keine Veränderung in der CD48-Expression, auch wenn spätere Arrays eine leichte Reduktion von CD48 in SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen zeigen. Es wäre daher möglich, dass SRF die Transkription von CD48 beeinträchtigt, dieses aber keinen Einfluss auf die Ausprägung des Proteins auf der Zelloberfläche hat.

### 3.2.14 Zusammenfassung

Um *targeting*- Konstrukte zur konditionalen Mutagenese in Mäusen herzustellen, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation zunächst die neue Technik des ET Klonierens in unserem Labor etabliert. Diese Methode, die auf der enzymvermittelten homologen *in vivo* Rekombination in *E. coli* beruht, ermöglicht die Mutagenese von DNA an jedem erwünschten Sequenzabschnitt, da sie unabhängig von Rekombinationsschnittstellen ist. Mit Hilfe dieser neuen Technik wurden *targeting*- Konstrukte erzeugt um die murinen Zytokin-Gene *IL-12/IL-23 p40* und *Ifngr2* konditionell ausschalten zu können. Des weiteren wurden Southern-Blot Strategien entwickelt, um die homologe Rekombination in ES-Zellen, die Deletion des Selektionsmarkers und die Deletion des jeweiligen Gens nachweisen zu können. Beide Konstrukte wurden in ES-Zellen transfiziert und für das *Ifngr2*-Konstrukt konnten bereits ES-



Zell-Klone mit homologer Rekombination isoliert werden. Aus diesen wurden erfolgreich Chimären generiert, die sich zur Zeit im Stadium der Rückkreuzung befinden.

Die konventionelle Mausmutante für den Transkriptionsfaktor SRF ist letal, eine Untersuchung immunologischer Prozesse im Hintergrund des kompletten SRF Knockouts ist daher nicht möglich. Durch Verpaarung einer konditionalen SRF Mausmutante mit einer CD19-Cre Rekombinase exprimierenden Mausmutante konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmalig Mausmutanten mit einem B-zell-spezifischen Knockout des Transkriptionsfaktors hergestellt und analysiert werden. Erste histologische und durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass SRF weder für die Entwicklung noch für das Überleben der meisten B-Zellen essentiell ist. Auch auf den Antikörperspiegel im Blut hat das Fehlen von SRF zumindest in gesunden Mäusen keinerlei Auswirkungen. Ebenso war kein Einfluss von SRF auf den intrazellulären Kalziumspiegel messbar.

Eine detaillierte immunhistochemische Färbung zeigte jedoch, dass es bei SRF defizienten Mäusen zum vollständigen Verlust der Marginalzonen B-Zellen kommt, ein Befund, der auch mit FACS-Analysen bestätigt wurde. Für die Entwicklung dieser Zellpopulation ist SRF also essentiell. Auch die Anzahl der B1-Zellen des Peritoneums ist bei SRF Mutanten im Vergleich zu Wildtypmäusen verringert. Des weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung von SRF an der Regulation der Proteinexpression der Oberflächenmoleküle IgM und CD19 und der Adhäsionsmoleküle  $\beta_1$ - und  $\beta_7$ -Integrin auf B-Zellen nachgewiesen werden.

Zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen wurden außerdem Gen-Array Analysen mit m-RNAs aus SRF-defizienten bzw. Wildtyp-B-Zellen durchgeführt. Erwartungsgemäß wurde hier eine Anzahl von Genen identifiziert, die an Proliferationsprozessen (*c-fos*, *junB*) oder an der Dynamik des Aktinzytoskelettes (*aktin-g*, *aktin-b*, *vinculin*, *vimentin*) beteiligt sind. Zusätzlich zeigten die Arrays eine Runterregulation der in Lymphozyten exprimierten Gene ICAM-2, CXCR4, CD22 und CD48 in SRF defizienten B-Zellen. Dieses konnte mit Hilfe von weiteren durchflusszytometrischen Analysen für die Gene CXCR4, und ICAM-2 auch auf Proteinebene bestätigt werden.

## 4 Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Herstellung zweier *targeting*-Konstrukte zur Generierung von konditionalen Mausmutanten und die phänotypische Analyse der *Srf*<sup>fl/fl</sup> *CD19*<sup>wt/cre</sup> Mäuse.

### 4.1 Verwendung der Technik des ET-Klonierens zur Erzeugung von *targeting*-Konstrukten für die konditionelle Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei *Targeting*- Vektoren zur Erzeugung konditionaler Mausmutanten für *IL-12/IL-23p40* und *Ifngr2* hergestellt. Dabei wurde die Methode des ET Klonierens in unserem Labor etabliert und verwendet um Selektionsmarker und Erkennungssequenzen für Rekombinationsenzyme in subklonierte Fragmente der Zielgene zu inserieren. Diese Methode, welche die *in vivo* Rekombination zwischen homologen DNA-Fragmenten in Bakterien ermöglicht, beruht auf der Verwendung von zwei viralen Rekombinationsenzymen, die über ein Plasmid in *E. coli* eingeschleust werden. In der Arbeit wurde die Methode eingesetzt um PCR Produkte, die eine Selektionskassette und Sequenzen für die Cre- bzw. FLP-Rekombinase enthielten, in genomische Genfragmente einzufügen. Die für die Rekombination benötigten homologen Bereiche von insgesamt 100 bp wurden über lange Primer in das PCR Produkt eingeführt.

Es kam während der Herstellung der Konstrukte mehrfach vor, dass die vorgesehene PCR mit den gelieferten Primern nicht funktionierte. Dies kann auf der Bildung von Sekundärstrukturen innerhalb der Primer beruhen und führte letztlich dazu, dass für eine vorgesehene Mutation mehrere Primerpaare bestellt werden mussten. Die erneute Bestellung von Primern verursachte Mehrkosten und führte zu deutlichen Zeitverlusten.

Ein weiteres Problem des ET-Klonierens ergab sich, wenn man die Methode zur Mutagenese in Plasmiden mit hoher Kopienzahl pro Bakterienzelle einsetzte. Der Vektor pBlueskript®, der als Klonierungsvektor für die Genfragmente von *IL-12/IL-23p40* und *Ifngr2* diente, ist ein sog. *high copy* Plasmid, von dem in einer Bakterienzelle mehrere hundert Kopien vorliegen können. Mit der Methode des ET-Klonierens werden aber nie alle in einer Zelle vorliegenden Plasmide mutiert, so dass man in den meisten Kolonien eine Mischung von ursprünglichem und mutiertem Plasmid vorliegen hat. Die beiden Formen lassen sich auch durch einen erneuten DNA-Transfer in Bakterien nicht immer trennen. Es wird dabei spekuliert, dass die Plasmide z.T. ineinanderhängende Ringe bilden, die sich nur durch einen Verdau mit

anschließender Religation und Transformation trennen lassen (persönliche Kommunikation mit F. Stewart).

Dieses Problem tritt bei der Mutagenese eines BAC nicht auf, da dieser in nur einer Kopie pro Bakterienzelle vorkommt. In der Arbeit wurde eine loxP Sequenz zusammen mit einer Selektionskassette in das *Ifngr2* Gen eingefügt, das als genomisches Fragment innerhalb eines BACs vorlag. Da BACs bis zu 300 kb genomische Sequenz enthalten, sollte bei der Mutagenese eines BACs durch ET-Klonierung ausgeschlossen werden, dass der Bereich, den man für die homologe Rekombination auswählt, sog. repetitive Elemente enthält.

Solche Abschnitte, in denen sich mehr oder weniger komplexe Sequenzen wiederholen, eignen sich möglicherweise nicht für die Methode, da sie zu Fehlintegrationen der PCR-Produkte führen könnten. In der Arbeit wurden die Gensequenzen daher vor der Auswahl des zu mutierenden Bereichs auf das Vorkommen von repetitiven Elementen über eine Anfrage beim Censor-Server hin untersucht (173) und als repetitiv erkannte Sequenzen als Ziel für die ET Klonierung ausgeschlossen.

Zusammenfassend lässt sich die Methode des ET-Klonierens gut einsetzen, um Selektionsmarker zusammen mit Erkennungssequenzen für Rekombinasen zu integrieren. Verwendet man diese Methode in einem BAC, lässt sich bei einer anschließenden Subklonierung auf den integrierten Selektionsmarker selektionieren, wodurch die Identifizierung von positiven Klonen einfacher wird.

Die Unabhängigkeit von den natürlichen Restriktionsschnittstellen erweitert die Möglichkeiten Mutationen in ein interessierendes Gen einzuführen. Daher ist ET-Klonierung auch für die Mutagenese von Genen geeignet, die keine für die klassische Klonierung brauchbaren Restriktionsschnittstellen enthalten. Die Integration von zusätzlichen Restriktionsschnittstellen mittels ET-Klonierung vereinfacht zudem die Erstellung einer Southern-Blot Strategie. Der vom Hersteller angegebene Zeitraum von vier Wochen zur Herstellung eines Konstrukts konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Dabei hat sich die Erzeugung des benötigten PCR-Produkts als der limitierende Faktor erwiesen.

Nach erfolgreicher ET Klonierung der *targeting*-Vektoren wurden beide zur Elektroporation in ES-Zellen eingesetzt.

Für die konditionale Inaktivierung von *IL-12/IL-23p40* konnte bislang aus ca. 1500 analysierten Neomycin-resistenten Klonen kein Klon mit homologer Rekombination des *targeting*- Konstrukts nachgewiesen werden. Dieses könnte auf unterschiedliche Ursachen

zurückzuführen sein. Die homologe Rekombination in ES-Zellen ist unter anderem abhängig von der Länge der homologen Bereiche zwischen Zielgen und Konstrukt. Die gesamte Homologie zwischen dem *IL-12/IL-23 p40* Gen und dem *targeting*-Konstrukt beträgt 9,3 kb und die Arme des Konstrukts sind jeweils 8 kb und 1,3 kb lang. Dieser Bereich ist erfahrungsgemäß für eine homologe Rekombination ausreichend und hätte theoretisch zu einer Rekombinationshäufigkeit von 1/ 300 führen können (174, 175).

Neben der Homologie zwischen Konstrukt und Zielsequenz könnte auch die Konformation des Genlocus eine Rolle spielen. Geschlossene Konformationen der DNA, wie sie im Heterochromatin vorliegen, verringern möglicherweise die Wahrscheinlichkeit homologer Rekombination. Da es jedoch bei der Herstellung des vollständigen Knockouts zu keinen derartigen Problemen kam und die effiziente Rekombination dieses Konstruktes zumindest teilweise im gleichen Bereich des Gens erfolgte, ist diese Erklärung eher unwahrscheinlich (57).

Es konnte verschiedentlich gezeigt werden, dass isogene DNA, die aufgrund ihrer Herkunft aus dem gleichen Mausstamm 100%-ig mit der Sequenz des Ziellocus einer aus dem selben Mausstamm isolierten ES-Zelllinie übereinstimmt, mit höherer Frequenz homolog rekombiniert, als in Fällen in denen die ES-Zellen und die genomische DNA des *targeting*-Konstrukts aus verschiedenen Mausstämmen stammt. Da jedoch für die Herstellung des Konstrukts isogene DNA verwendet wurde (die DNA stammt aus C57/Bl6 Mäusen und die verwendeten F1-Zellen besitzen jeweils ein C57/Bl6 Allel), liegt auch hier kein offensichtlicher Grund für die nicht zu beobachtende Rekombination vor.

Als mögliche Ursache für die fehlende homologe Rekombination kommen außerdem Mutationen in Frage, die entweder bei der Herstellung oder Vermehrung des verwendeten BACs oder bei der Generierung des *targeting*-Konstrukts in Teilen der homologen DNA entstanden sind. Größere Mutationen wie Deletionen oder Inversionen können jedoch aufgrund von Restriktionsanalysen, bei denen alle Fragmente die erwartete Größe aufwiesen ausgeschlossen werden. Die Orientierung aller klonierten Fragmente wurde zudem durch Sequenzierung der Intron/ Exon-Grenzen überprüft.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten das vorliegende Konstrukt zu verändern. Um die Anzahl an G418 resistenten Klonen mit zufälliger Integration des Vektors zu reduzieren, kann man zur negativen Selektion Gene zur Expression der Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-TK) oder des Diphtherie-Toxins an ein Ende des Konstrukts integrieren. Bei homologer Rekombination in ES-Zellen werden diese Kassetten nicht ins Genom integriert, bei zufälliger Integration wird in einem Teil der transfizierten Zellen das gesamte Konstrukt mit den

Kassetten zur negativen Selektion integriert, was zum Absterben der Zellen mit Integration dieser Selektionsmarker führt. Bei der Verwendung der HSV-TK muss dazu dem Medium noch Ganciclovir zugegeben werden, das durch die HSV-TK in ein für die Zellen toxisches Produkt umgewandelt wird. Beide Methoden steigern jedoch nicht die Rekombinationshäufigkeit des Konstrukts sondern erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass nach der Selektion hauptsächlich Klone mit homologer Rekombination übrig bleiben.

Eine Maßnahme um die Rekombinationshäufigkeit zu erhöhen, wäre die Verlängerung des Konstruktes an beiden Armen, da eine größere Homologie bis zu einem gewissen Grad die Wahrscheinlichkeit der Rekombination erhöht. In diesem Fall muss dann aber eine neue Southern-Blot Strategie ausgearbeitet werden, da die dafür vorgesehenen *EcoRI* Schnittstellen durch eine Verlängerung der Arme innerhalb des Konstruktes liegen würden (s. Abb. 3.5).

Anstelle des bisher verwendeten Konstrukts, das aus einem subklonierten modifizierten Genfragment in einem Klonierungsvektor besteht, kann auch ein modifizierter BAC zur Transfektion benutzt werden. Dieser enthält aufgrund seiner Größe maximale homologe Bereiche und kann sehr effizient homolog rekombinieren (176). Der Nachweis der homologen Rekombination kann dann nicht mehr mit Southern-Blot Analysen erfolgen, sondern wird mit der FISH-Methode durchgeführt.

Es gibt Versuche mit Fibroblasten-Zellen, in denen Konstrukte mit einer Sequenz aus dem Genom von SV40, die als Kernlokalisierungssequenz für die Translokation des Virusgenoms in den Zellkern dient, eine erhöhte Frequenz der homologen Rekombination aufwiesen (177). Diese Methode, die entwickelt wurde, um homologe Rekombination in somatischen Zellen zu ermöglichen, lässt sich eventuell auch auf ES-Zellen übertragen.

Zunächst soll jedoch das Konstrukt mit einer Kassette für die Selektion auf homologe Rekombinationsereignisse versehen und dann erneut in F1 ES-Zellen transfiziert werden. Die nachfolgenden Schritte hängen vom Ergebnis dieser Transfektion ab.

Das Konstrukt zur konditionalen Mutagenese von *Ifngr2* besitzt insgesamt 9 kb homologe Bereiche zum Zielgen und lieferte in einer einzigen Transfektion mit 600 analysierten Neomycin- resistenten Klonen drei Klone mit homologer Rekombination, wovon einer bisher zur Blastozysteninjektion eingesetzt wurde. Die dabei erzeugten chimären Mäuse wurden mit C57/Bl6 Mäusen gekreuzt und die Nachkommen werden zur Zeit auf die Keimbahntransmission der Mutation hin untersucht. Mäuse mit Keimbahntransmission werden dann zunächst mit Flp-Deleter Mäusen verpaart, woraufhin die Neokassette in der Zygote deletiert wird. Die daraus resultierenden Mäuse mit gefloxtem *Ifngr2*-Allel sollen mit

verschiedenen transgenen Mäusen für die zelltypspezifische Expression der Cre-Rekombinase verpaart und vor allem in Infektionsversuchen auf die Auswirkungen des Genverlusts in bestimmten Zellen untersucht werden. Von besonderem Interesse sind dabei die Verpaarungen mit der T-Zell-spezifischen CD4-Cre Maus, mit B-zell-spezifischen Cre-Mäusen wie CD19-Cre oder Ig $\alpha$ -Cre und der Makrophagen spezifischen LysM-Cre Maus.

## 4.2 Phänotypische Analyse der Auswirkungen der Deletion von *Srf* in B-Zellen

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des Verlusts von *Srf* in B-Zellen analysiert. Der Transkriptionsfaktor SRF, der ubiquitär und daher auch in Lymphozyten exprimiert wird (178), spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und bei der Differenzierung von Muskelzellen und Neuronen. Verschiedene Untersuchungen weisen auch auf Funktionen von SRF in Lymphozyten hin (96, 97). Es wurden daher die phänotypischen Veränderungen in Mäusen mit Deletion des *Srf*-Gens in B-Zellen untersucht, wobei histologische Untersuchungen verschiedener lymphatischer Organe und Expressionstudien von Oberflächenmolekülen auf B-Zellen im Vordergrund standen. Da es sich bei SRF um einen Transkriptionsfaktor handelt, sollte zu dem mittels RNA-Arrays untersucht werden, ob es B-zell-spezifische Gene gibt, deren Aktivität signifikant durch SRF reguliert wird.

Um die Funktion von SRF in B-Zellen zu untersuchen, wurden Mäuse mit geflochtenen *Srf*-Allelen (*Srf*-flex1 neo (5) mit CD19-Cre-Mäusen (138) verpaart. Die verwendeten *Srf*-flex1 neo-Mäuse enthalten noch das Neomycin-Gen, da zunächst aus ES-Zellen ohne Neokassette keine Nachkommen mit Keimbahntransmission der Mutation erhaltenen wurden.

Mittlerweile sind auch die sog. *Srf*-flex1 Mäuse erhältlich, die keine Neokassette mehr im Genom enthalten. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch kein Einfluss der Neokassette in den verwendeten *Srf*-flex1neo- Mäusen festgestellt werden. In einer anderen Arbeitsgruppe wurden Mäuse mit geflochtenem Exon 2 des *Srf*-Gens generiert, bei denen ebenfalls die Neokassette im Genom verblieben ist. Auch hier wurde kein Einfluss der Neokassette auf den Phänotyp der Mäuse festgestellt (179).

Als erstes wurde mittels Southern-Blot Analyse der Deletionsgrad von *Srf* in *Srf*<sup>fl/fl</sup> *CD19*<sup>wt/cre</sup> - Mäusen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten reifen B-Zellen (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>) beide *Srf*-Allele deletiert hatten, woraus sich folgern lässt, dass das Fehlen von SRF in den meisten B-Zellen keinen Einfluss auf die Entwicklung und das Überleben hat. Dennoch konnte insgesamt eine Reduktion an CD19<sup>+</sup> B-Zellen im Knochenmark festgestellt werden (s. Kap. 3.2.5), ohne dass dabei eine bestimmte B-Zellpopulation besonders stark reduziert war. SRF scheint also unter bestimmten Bedingungen einen Einfluss auf B-Zellen zu haben, es bleibt jedoch offen, unter welchen Voraussetzungen SRF eine Rolle spielt und warum ein Großteil der B-Zellen davon nicht betroffen ist.

Die auffälligsten Merkmale des Verlusts von SRF in B-Zellen sind neben der allgemeinen Reduktion der Anzahl an B-Zellen das Fehlen von Marginalzonen B-Zellen (s. Kap. 3.2.7), eine Reduktion der B1-Population (s. Kap. 3.2.8) und eine Reduktion der IgM-Expression (s. Kap 3.2.5).

Des weiteren konnten durch die vergleichende Analyse der Genexpression mittels RNA-Arrays und anschließender Analyse der Proteinexpression verschiedene durch SRF in ihrer Expression beeinflusste Oberflächenmoleküle identifiziert werden.

#### **4.2.1 Analyse der Expression von IgM und IgD**

Die Expressionsanalyse von IgM auf der Oberfläche von SRF<sup>-/-</sup>-B-Zellen zeigte eine deutliche Reduktion verglichen mit SRF<sup>+/+</sup> B-Zellen. Eine leichte Reduktion ist bereits in Stadium der unreifen IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> Zellen zu beobachten und der Effekt ist in reifen B-Zellen verstärkt. IgM ist der erste B-Zell-Rezeptor, der nach erfolgreichem Rearrangement der Immunglobulinloci auf der Oberfläche der unreifen B-Zellen (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>) exprimiert wird. Signale, die über den BCR vermittelt werden, dienen der Selektion und dem Überleben der Zellen. Besonders B1-Zellen und MZB scheinen für ihre Entwicklung und/oder ihr Überleben stärkere Signale durch den BCR zu benötigen (180), was bedeuten könnte, dass die geringere Dichte von IgM auf SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen möglicherweise zur Reduktion der CD5<sup>+</sup> B1-Zellen und zum Verlust der MZB beiträgt (181). Die Expression von IgD ist dagegen in den Mutanten unverändert und da IgD und IgM in eine gemeinsame Prä-RNA transkribiert werden, bedeutet dies, dass SRF weder direkt noch indirekt die IgM –Transkription beeinflusst. Möglicherweise trägt die verringerte Expression von Igα (CD79a) und Igβ (CD79b), die in den Arrays beobachtet wurde, zur verminderten Ausprägung von IgM auf der Zelloberfläche bei, da die Immunglobuline wie IgM nur in Verbindung mit diesen invarianten akzessorischen Immunglobulinen zusammen auf der Oberfläche exprimiert werden.

#### **4.2.2 Verlust von MZB in *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/cre</sup>* Mäusen**

Der Verlust von SRF in ES-Zellen und Neuronen führt zu Defekten im Aufbau des Aktinzytoskeletts und damit einhergehend zu Migrationsdefekten (108, 182). Da B-Zellen ausgehend vom Ort ihrer Entstehung im Knochenmark die verschiedenen lymphatischen Organe besiedeln müssen, sollte festgestellt werden, ob der Verlust von SRF in B-Zellen eventuell Auswirkungen auf diesen Prozess hat. In histologischen Untersuchungen verschiedener lymphatischer Organe konnten allerdings in den meisten Geweben keine



Auffälligkeiten hinsichtlich der Morphologie und der Anwesenheit von B-Zellen in den Follikeln beobachtet werden. Die Analyse der Milz zeigte jedoch, dass in *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/Cre</sup>* Mäusen, in denen eine nahezu vollständige Deletion von *Srf* in den B-Zellen erfolgt, die Population der Marginalzonen B-Zellen fehlt (s. Abb. 3.23 und 3.24). Die histologischen Befunde wurden mit durchflusszytometrischen Analysen, bei denen B-Zellen der Milz mit Antikörpern gegen CD21 und CD23 gefärbt wurden, bestätigt (s. Abb. 3.25). Die MZB, die eine spezialisierte Population der B-Zellen in der Milz darstellen, lassen sich durch das Expressionsmuster an Oberflächenmarkern von anderen B-Zell-Populationen unterscheiden (183). Sie stehen durch ihre besondere Position am Marginalsinus in ständigem Kontakt mit Blut und den darin enthaltenen Antigenen. Von den follikulären B-Zellen unterscheiden sie sich funktional durch ihre Fähigkeit innerhalb kürzester Zeit T-Zell-unabhängig Antikörper zu produzieren, wobei sie besonders durch Bestandteile der Bakterienzellwand aktiviert werden können. Die MZB stellen somit eine frühe Verteidigungslinie gegen Erreger im Blut dar (180).

Untersuchungen der B-Zell-Entwicklung haben gezeigt, dass sich MZB und follikuläre B-Zellen aus gemeinsamen Vorläuferzellen entwickeln. Die Entscheidung für die Entwicklung in die eine oder andere Richtung ist dabei möglicherweise von der Stärke des Signals abhängig, das während einer „positiv“-Selektion in der Entwicklung der B-Zellen über den B-Zell-Rezeptor vermittelt wird. Diese Vermutung wird durch die Analyse von verschiedenen transgenen Mäusen und Knockout Mäusen, die Defekte im Signalweg des B-Zell-Rezeptors zeigen, unterstützt.

Es gibt verschiedene genetisch veränderte Mauslinien, die als Phänotyp unter anderem einen Verlust der MZB aufweisen. In den für diese Arbeit durchgeführten RNA-Arrays konnte der Phänotyp nicht mit der Expression eines einzigen Gens in Verbindung gebracht werden, jedoch wurden eine Reihe von differentiell regulierten Genen identifiziert, deren veränderte Expression möglicherweise für den Verlust der MZB eine Rolle spielen, dazu gehören *c-fos*, *Cd19* und *Cxcr4*.

*c-fos*, das als *immediate early gene* in die Zellproliferation involviert ist, ist ein wichtiges Zielgen von SRF (71) und die Überexpression von *c-fos* in Mäusen fördert die Entwicklung von MZB in der Milz (184). Es ist daher denkbar, dass die durch den Verlust von SRF verursachte Reduktion der *c-fos*-Expression (s. Tabelle 2) negativen Einfluss auf die Entwicklung der MZB hat und somit zu dem beobachteten Phänotyp in *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/cre</sup>* beiträgt.

In den durchflusszytometrischen Analysen und den RNA-Arrays konnte eine reduzierte Expression von CD19 in SRF-/- B-Zellen nachgewiesen werden. Zum einen wird dies durch die Insertion des Cre-Gens in ein Allel der CD19-Cre- Mäuse verursacht, so dass diese Tiere hemizygot für CD19 sind, zum anderen führt die Deletion beider Srf-Allele zu einer zusätzlichen Verminderung von CD19 auf der Zelloberfläche. CD19 bildet zusammen mit CD21 und CD81 den Korezeptorkomplex des B-Zell-Rezeptors und ist für die Erhaltung der follikulären B-Zellen und der MZB essentiell (185-187). CD19-Cre Mäuse zeigen trotz der verringerten CD19-Expression keine phänotypischen Anomalien und weisen auch keine Reduktion der MZB auf (122). Die vollständige Deletion von CD19 in Mäusen führt dagegen zu Entwicklungsdefekten von B-Zellen in neonatalen Mäusen, einer starken Reduktion der follikulären B-Zellen und der B1 Zellen sowie einem Verlust der MZB in adulten Tieren. Das beweist, dass CD19 ein wichtiger Faktor in der Entwicklung und Erhaltung von B-Zellen ist (138, 188). Die Defekte in CD19-/- Mäusen lassen sich durch die Überexpression des anti-apoptotischen Gens *Bcl-2* aufheben, so dass daraus gefolgert wird, dass *Bcl-2* ein wichtiges Ziel der Signale ist, die durch CD19 vermittelt werden (187). *Bcl-2* ist zudem ein bekanntes Zielgen von SRF (105) und zumindest im dritten RNA-Array konnte eine Reduktion der *Bcl-2* Expression in SRF-/- B-Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 2). Ob die in SRF-/- B-Zellen gezeigte zusätzliche Verringerung der CD19-Expression zu dem Phänotyp in den *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/cre</sup>* Mäusen beiträgt, möglicherweise über Wechselwirkung mit *Bcl-2*, kann hier nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass die starke Reduktion von CD19 durch den Cre-*Knockin* keine phänotypische Auswirkung hat, spricht eher gegen einen Effekt durch die geringe zusätzliche Reduktion durch den Verlust von SRF. Andererseits werden viele biologische Prozesse über das Erreichen von Schwellenwerten reguliert so dass eine zusätzliche geringfügige Änderung, wenn sie zum unter bzw. Überschreiten eines solchen Schwellenwertes führt durchaus einen Effekt zeigen kann.

Ein weiterer Faktor, der in SRF-/- B-Zellen auf RNA- und Proteinebeneschwächer exprimiert wird (s. Tabelle 2), ist der Chemokinrezeptor CXCR4, der konstitutiv auf vielen Zelltypen exprimiert wird, u.a. auch auf T- und B-Zellen. Auf T-Zellen wirkt er als Kofaktor für das Eindringen von HI-Viren, auf B-Zellen lässt sich CXCR4 bereits in den frühesten Entwicklungsstadien nachweisen und seine Expression wird verstärkt bei der T-Zell-unabhängigen und der T-Zell-abhängigen Differenzierung von naiven und Gedächtnis- B-Zellen zu Plasmazellen (189). Die konditionale Inaktivierung des Gens in B-Zellen führt zu einer Akkumulierung von frühen B-Zellen (IgM<sup>+</sup>) im Blut, was zeigt, dass CXCR4 und sein Ligand CXCL12 (SDF-1) für die Retention dieser Zellen im Knochenmark eine wichtige

Rolle spielen. Des weiteren führt der konditionale Knockout auch zur Reduktion von reifen B-Zellen in der Milz, B1-Zellen und MZB (167). Der vollständige Knockout des Gens ist letal und zeigt Defekte in der pränatalen Entwicklung der Lymphozyten und in der Migration von Neuronen (190).

Alle drei bisher beschriebenen Proteine könnten aufgrund ihrer SRF-abhängigen verminderten Expression an dem Verlust der Marginalzonen B-Zellen beteiligt sein. Das Fehlen der MZB kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte die Deletion von *Srf* bereits die Entwicklung dieser Zellen hemmen und zum anderen ist es möglich, dass die MZB durch den Verlust von SRF verstärkt der Apoptose unterliegen und daher in Schnitten und FACS-Analysen nicht nachweisbar sind.

#### 4.2.3 Reduktion der CD5<sup>+</sup> B1-Zellpopulation im Peritoneum

Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen des Peritoneums zeigte in Mäusen, in denen die B-Zellen kein SRF exprimieren, eine Reduktion der CD5<sup>+</sup> Zellen. Diese Zellen, deren Ursprung kontrovers diskutiert wird (191), stellen neben den follikulären B2-Zellen und den MZB die dritte bekannte Population reifer B-Zellen dar.

Im Gegensatz zu den konventionellen B-Zellen, bei denen im unreifen Zustand die Autoreaktivität des B-Zell-Rezeptors zu Rezeptor-Editierung, Anergie oder Apoptose führt, benötigen die B1-Zellen scheinbar eine stärkere Interaktion mit Autoantigenen für ihre Entwicklung und zum Überleben (192). Daher wäre es denkbar, dass die reduzierte Anzahl an B1-Zellen mit der Reduktion des IgM auf SRF -/- B-Zellen zusammen hängt, wenn dadurch die zur Entwicklung benötigte Signalstärke beeinträchtigt ist. Allerdings geben die bisher durchgeführten Untersuchungen der Kalzium-Mobilisierung *in vitro* keinen Hinweis auf eine geringere Aktivierbarkeit der B-Zellen. Die Reduktion der B1-Zellen korreliert in *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/cre</sup>* nicht mit der Konzentration von IgM im Blut, dass zu einem großen Teil von B1-Zellen gebildet wird, da in den *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/cre</sup>* die IgM-Konzentration denen der Kontrollmäuse entspricht (159).

#### 4.2.4 Untersuchungen von B-Zell-Funktionen *in vitro*

Um erste Anhaltspunkte über die Funktionalität der SRF -/- B-Zellen zu erhalten, wurden die Kalzium-Mobilisierung und die basalen Antikörperlevels im Serum untersucht. Der Einstrom von Kalzium aus intrazellulären Speichern ins Zytoplasma, kann u.a. durch die Ligation des B-Zell-Rezeptors ausgelöst werden. Die beiden Proteine Vav-1 und Vav-2 sind Komponenten einer Signalkaskade, die zu diesem Einstrom von Ca<sup>2+</sup> Ionen ins Zytoplasma führt und in

dessen Folge die SRF-abhängige Transkription von *c-fos* induziert wird. Der Knockout beider Gene führt zu verschiedenen Defekten, dabei unter anderem zu einer Reduktion der B1-Zellen und einer verminderten T-Zell-unabhängigen Immunantwort (193). Die Untersuchung des Liganden induzierten Einstroms von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen sollte die Frage klären ob dieser Signalweg nicht nur Effekte auf die Aktivität von SRF hat, sondern umgekehrt auch über SRF beeinflusst wird oder ob die deutliche Reduktion von IgM auf der Oberfläche von SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit dieser Zellen hat. Es konnte in diesem Versuch kein Unterschied zwischen SRF-defizienten Zellen und Kontrollzellen beobachtet werden, so dass die Funktionalität der Zellen in Bezug auf die Signalweiterleitung und die verminderte Expression von IgM auf der Oberfläche nicht beeinträchtigt zu sein scheint. Dieser Versuch spiegelt allerdings nicht die *in vivo* Situation wieder, so dass abschließende Aussagen über die Aktivität von SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen erst nach der Immunisierung von Mäusen oder nach Infektionsexperimenten gemacht werden können.

Da die wichtigste Funktion von B-Zellen die Antikörperproduktion zur Abwehr von Erregern ist, sollte in einem ersten Versuch die Auswirkung der SRF-Deletion in B-Zellen aus *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/cre</sup>* auf die konstitutiven Konzentrationen der Immunglobuline ermittelt werden. Es zeigten sich auch hier keine Unterschiede zwischen Mäusen mit SRF-defizienten B-Zellen und den Kontrollmäusen. Dies kann entweder bedeuten, dass das Fehlen von SRF keinen Einfluss auf die Produktion von Immunglobulinen in gesunden Mäusen hat oder dass die Antikörper-produzierenden Plasmazellen, die bisher nicht näher untersucht wurden, keine vollständige Deletion von *Srf* aufweisen. Möglicherweise zeigen sich Auswirkungen des *Srf*-Verlustes auch erst bei Immunisierung der Mäuse oder in Infektionsversuchen.

#### 4.2.5 Vergleichende Analyse der Genexpression von Wildtyp-Mäusen und Mutanten auf RNA-Ebene und Proteinebene

Zur Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors SRF in B-Zellen wurden RNA-Arrays durchgeführt und die Genexpressionsmuster von SRF<sup>+/+</sup> und SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>) miteinander verglichen. Die Arrays geben zwar keine Hinweise auf B-zell-spezifische Gene, die besonders stark durch SRF reguliert werden, doch konnten einige lymphozyten-spezifische Gene identifiziert werden, die SRF-abhängig exprimiert werden und von denen einige zu dem beobachteten Verlust der MZB in *Srf<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>wt/cre</sup>* beitragen könnten (s. Kap 4.3.1).

Wie erwartet wurden durch die Deletion von *Srf* besonders einige *immediate early genes* (*c-fos*, *junB*, *egr-1*) schwächer exprimiert (s. Tabelle 2). Die Differenz zwischen der Expression

in Wildtyp-Zellen und SRF  $-/-$  Zellen ist in den Arrays jedoch nicht sehr hoch, da diese Gene in ruhenden Zellen nur schwach exprimiert werden und für die basale Expression dieser Gene SRF nicht nötig ist (106). Auch verschiedene Aktogene (*aktin-beta*, *aktin gamma*, *vinculin*) deren Regulation durch SRF bekannt ist, werden in SRF  $-/-$  B-Zellen deutlich schwächer exprimiert. Dieses scheint sich jedoch nicht in der Migration der B-Zellen in periphere Lymphorgane bemerkbar zu machen, da in histologischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen der Organe keine offensichtliche Reduktion an B-Zellen zu beobachten war und die Architektur der B-Zell-Follikel in den Lymphknoten keine Auffälligkeiten zeigte.

Aufgrund der Daten des ersten Arrays wurde die Expression der auf mRNA-Ebene differentiell exprimierten Gene CD22, CD48, CXCR4 und ICAM-2 im Durchflusszytometer auf Protein-Ebene untersucht. Für CD22 konnte keine verminderte Proteinexpression gezeigt werden und in den später folgenden Arrays wurde für dieses Gen keine SRF-abhängige Expression mehr nachgewiesen. Für die Gene ICAM-2 und CXCR4 ließ sich sowohl auf mRNA-Ebene als auch in der Expression des Proteins eine Korrelation mit der Expression von SRF feststellen, wobei die Array-Daten z.T. große Schwankungen zeigten.

Die Expression von CXCR4 ist in allen drei Arrays in SRF  $-/-$  B-Zellen reduziert und die durchflusszytometrische Analyse konnte diese Reduktion auch auf Proteinebene nachweisen. Da sich im Promotor keine CARG-boxen oder AP-1 Sequenzen für die Interaktion mit *c-fos* befinden ist eine direkte Regulierung von CXCR4 durch SRF auszuschließen (194). Die Analysen der CXCR4-Expression zeigten unterschiedliche Ergebnisse bei B-Zellen der Milz und B-Zellen des Knochenmarks. In der Milz, wo hauptsächlich reife B-Zellen vorliegen, zeigen die SRF  $-/-$  B-Zellen eine deutliche Reduktion der CXCR4-Expression und bestätigen damit die Ergebnisse der Arrays. Im Knochenmark dagegen, wo keine Reduktion sichtbar wird, ist der Effekt möglicherweise durch das Vorhandensein früher B-Zell-Stadien in der CD19<sup>+</sup> Population überlagert, in denen bisher keine Deletion von Srf stattgefunden hat. Möglich ist auch, dass vor der Deletion gebildetes Protein in den Zellen vorliegt so dass die Deletion und damit eine Reduktion von CXCR4 erst zu einem späteren Zeitpunkt wirksam wird. ICAM-2 wurde ebenfalls aufgrund der Daten des ersten Arrays (s. Tabelle 2) auf seine Expression in B-Zellen hin untersucht. Im Gegensatz zu den Daten dieses Arrays, die eine leichte Reduktion der ICAM-2 Expression zeigten, konnte in den durchflusszytometrischen Analysen eine leicht erhöhte Expression dieses Adhäsionsmoleküls auf den SRF  $-/-$  B-Zellen beobachtet werden. Dabei zeigte sich ein ähnlicher Unterschied zwischen Milz- und Knochenmarks-B-Zellen wie in der CXCR4-Expression. Dieser könnte, wie bereits beschrieben, auf einer zeitlichen Verzögerung des Effektes durch Protein, dass vor der

Deletion gebildet wurde, beruhen. Im Promotor von ICAM-2 sind bis jetzt weder CArG-Boxen noch Ap1-Bindungssequenzen beschrieben worden, so dass ICAM-2 kein direktes Zielgen von SRF ist und daher der beobachtete Einfluss von SRF auf die ICAM-2 Expression wahrscheinlich indirekt ist. Interessanterweise können ICAM-2 und CD19 den selben Signalweg über die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) aktivieren und für ICAM-2 konnte zumindest in humanen CD19 B-Zellen eine antiapoptotische Wirkung nachgewiesen werden (170, 195).

Die drei durchgeführten Arrays wiesen in ihren Ergebnissen große Schwankungen auf, die verschiedene Ursachen haben können. Zum einen gibt es natürliche biologische Schwankungen, die sich alleine aus der Verwendung von Zellen verschiedener Mäuse ergeben, zumal es sich bei den verwendeten Mäusen nicht um Tiere aus Inzuchtstämmen handelt. Des weiteren gibt es beim gesamten Prozess der Probenaufarbeitung von der Isolierung der Zellen und der RNA, der anschließenden Amplifikation der RNA und der Markierung viele Schritte, die durch Pipettierungenauigkeiten, unterschiedliche Temperatur und geringe zeitliche Differenzen während der Aufarbeitung usw. sehr vielen Schwankungen unterliegen. Diese lassen sich nicht vermeiden, können aber einen Einfluss auf das Ergebnis eines Arrays haben. Daher lassen sich Arrays meistens nur für sehr stark exprimierte Gene mit starken Unterschieden in der Expression reproduzieren, während die in dieser Arbeit untersuchten Gene meist eine schwache Expression und /oder eine geringe Variation in der Expression aufwiesen.

Der große Vorteil der Arrays liegt in der Menge an Genen, deren Expression in einer Analyse miteinander verglichen werden kann. Die Arrays liefern daher erste Anhaltspunkte bei der Suche nach Unterschieden in der Genexpression, die dann in jedem Fall durch weitere Untersuchungen wie Analyse der Protein-Expression oder durch *realtime PCR*, die bestätigt werden müssen.

#### **4.2.6 Expression von Adhäsionsmolekülen**

Die Adhäsionsmoleküle wie ICAMs und Integrine sind an Prozessen der Migration, des *homing* und der Retention von Lymphozyten in bestimmten Kompartementen beteiligt. Daneben können sie über ihre Interaktion mit dem Zytoskelett oder mit anderen Oberflächenmolekülen Signalkaskaden in der Zelle auslösen (170). Das ligandenabhängige „clustern“ von Integrinen führt über die Rekrutierung von Komponenten des Zytoskeletts wie

z.B.  $\alpha$ -Aktinin und Vinculin. Es kommt zu einer Signalkaskade, die in Folge z.B. die Kinase ERK aktivieren. ERK wiederum phosphoryliert die TCFs Sap-1, Elk und Net, die zusammen mit SRF die Transkription von c-fos fördern (74). Ob umgekehrt SRF über seinen Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts die Expression von Integrinen oder deren Aktivität regulieren kann, ist unklar. Die Expressions-Analyse der  $\beta 1$ - und  $\beta 7$ - Integrine auf SRF -/- B-Zellen zeigte zumindest eine leichte Reduktion in ihrer Expression, die auf eine Korrelation von SRF- und Integrin-Expression hinweist. Zwischen den Analysen und den untersuchten Organen traten Schwankungen auf, die eine natürliche biologische Variabilität repräsentieren können, oder auch mit der Spezifität der verwendeten Antikörper zusammenhängen. Integrine können abhängig von ihrem Aktivierungszustand zwei Konformationen einnehmen (196) und es ist nicht klar, ob die verwendeten Antikörper beide, oder nur eine der möglichen Konformationen erkennen. Im Gegensatz zur Expression der Integrine ließ sich für ICAM-2 eine geringe Verstärkung in der Expression beobachten, die z.T. durch die Array-Daten belegt wird. Ob diese Effekte auch die Migrationsfähigkeit der Zellen verändern, kann nur durch nachfolgende Experimente belegt werden.

Die in dieser Arbeit gezeigten Auswirkungen der *Srf* -Deletion in B-Zellen sollen durch verschiedene weiterführende Experimente unterstützt und spezifiziert werden. Um zu zeigen, ob die Deletion von *Srf* in einem früheren Stadium der B-Zell-Entwicklung stärkere Auswirkungen auf die B-Zell-Entwicklung hat, sollen *Srf*-flex1 Mäuse mit Mäusen verpaart werden, welche die Cre-Rekombinase unter dem Promotor des  $Ig\alpha$ -Gens exprimieren. Da  $Ig\alpha$  bereits zu einem früheren Zeitpunkt als CD19 exprimiert wird, sollte auch die *Srf*-Deletion in B-Zellen eines früheren Entwicklungsstadiums erfolgen. Möglicherweise sieht man dann einen ähnlichen Effekt wie in *Srf*<sup>fl/fl</sup> CD4-Cre Mäusen, in denen die Entwicklung der T-Zellen durch die Deletion von *Srf* im sog. „Doppelt-positiven“ Stadium unterbrochen wird (A.Schippers, unpublizierte Daten).

Den Verlust der MZB kann man funktionell durch die Immunisierung der Mäuse mit NP-Ficoll nachweisen. NP-Ficoll löst eine schnelle T-Zell-unabhängige Produktion von Antikörpern durch die MZB aus, die sich bereits wenige Tage nach der Immunisierung im Blut von Wildtyp-Mäusen nachweisen lassen. Bei Verlust der MZB sollte sich innerhalb dieser Zeit keine Veränderung der Antikörperkonzentration im Blut zeigen.

In Infektionsversuchen könnte überprüft werden, ob die geringeren Level von IgM und CD19 auf der Oberfläche einen Einfluss auf die Funktionalität der SRF-/- B-Zellen *in vivo* haben.

Die RNA-Array Daten, die auf eine Verminderung von Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  hinweisen und damit eine mögliche Erklärung der geringeren Expression von IgM auf der Zelloberfläche können mittels Realtime-PCR verifiziert werden.

Da in gesunden Mäusen die Immunglobulinkonzentrationen keine Veränderungen aufwiesen, müsste die Frage geklärt werden, ob SRF auf deren Produktion keinen Einfluss hat, oder ob die produzierenden Plasmazellen eventuell gar keine Deletion von *Srf* aufweisen. Dazu müsste man Plasmazellen isolieren und die Deletionsgrad von *Srf* in einem Southern-Blot analysieren.

Weitere Prozesse, in die SRF bekanntermaßen involviert ist, sind die Apoptose, die SRF durch Verstärkung der Expression antiapoptotischer Gene hemmt, und die Migration und Adhäsion die SRF durch seinen Einfluss auf das Aktinzytoskelett reguliert. Um die Apoptose in B-Zellen aus *Srf*<sup>fl/fl</sup> *CD19*<sup>wt/cre</sup> und Wildtyp-Mäusen zu vergleichen, gibt es verschiedene Methoden, wovon eine die Annexin-Färbung ist, bei der Phospholipid-phosphatidylserin, ein Bestandteil der Zellmembran angefärbt wird. Dieser ist nur bei apoptotischen Zellen von außen für den Farbstoff zugänglich. Der Anteil apoptotischer Zellen in einer Population lässt sich so am Durchflusszytometer bestimmen. Bei dieser Analyse wird eine verstärkte Apoptose in SRF<sup>-/-</sup> B-Zellen erwartet.

Um die Organisation des Aktinzytoskeletts in *Srf*-defizienten B-Zellen zu untersuchen, sollen Färbungen mit Fluorochrom-gekoppeltem Phalloidin auf migrierenden B-Zellen durchgeführt werden. Phalloidin färbt F-Aktin an und könnte so Aufschluss über Defekte in der Polymerisation von Aktin bei der Migration geben. Daneben sollen die basale Migration und die Migration der B-Zellen nach Stimulierung mit anti-IgM untersucht werden. Erste Untersuchungen weisen bereits auf eine verringerte basale Migrationsfähigkeit der B-Zellen in Abwesenheit von SRF hin.

Ob die auf RNA- und Protein-Ebene gezeigte verminderte Expression von CXCR4 einen funktionalen Effekt hat, könnte in einem Ca<sup>2+</sup>-Flux Assay nach Stimulierung der B-Zellen mit dem Liganden CXCL12 (SDF-1) untersucht werden, oder in einem Migrationsversuch entlang eines Gradienten von CXCL12.

Die drei durchgeführten RNA-Arrays zeigten insgesamt nur geringe Änderungen zwischen den Expressionsmustern von Wildtyp- und SRF<sup>-/-</sup> Zellen. Daher könnte man bei Wiederholung eines Arrays die Zellen vor der Isolierung der RNA mit verschiedenen Stimulanzien aktivieren. Durch eine kurze (ca. 30 min) Kultivierung der Zellen in Serumhaltigem Medium könnte man die Expression der immediate early genes *in vitro* aktivieren



was zu deutlicheren Unterschieden zwischen SRF<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Zellen führen sollte. Möglicherweise lassen sich so auch B-zell-spezifische *immediate early genes* identifizieren. Ebenso könnte man die Zellen vor der Isolierung der RNA statt mit Serum auch mit einem anti-IgM Antikörper stimulieren und so möglicherweise Gene identifizieren, deren Abhängigkeit von SRF sich erst im aktivierten Zustand der B-Zellen zeigt.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Torres R.M., K. R. 2002. Laboratory protocols for conditional gene targeting. *Oxford University Press., Oxford New York, Tokyo.*
2. Pestka, S., C. D. Krause, and M. R. Walter. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202:8.
3. Buchwalter, G., C. Gross, and B. Wasylyk. 2004. Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324:1.
4. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R. A. Kastelein. 2003. The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. *Immunity* 19:641.
5. Wiebel, F. F., V. Rennekampff, K. Vintersten, and A. Nordheim. 2002. Generation of mice carrying conditional knockout alleles for the transcription factor SRF. *Genesis* 32:124.
6. van de Vosse, E., E. G. Lichtenauer-Kaligis, J. T. van Dissel, and T. H. Ottenhoff. 2003. Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (beta1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogenetics* 54:817.
7. Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R. Hewick, S. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, and G. Trinchieri. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170:827.
8. D'Andrea, A., M. Rengaraju, N. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Aste, S. Chan, M. Kobayashi, D. Young, and E. Nickbarg. 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 176:1387.
9. Macatonia, S., N. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. Hsieh, J. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154:5071.
10. Cassatella, M. A., L. Meda, S. Gasperini, A. D'Andrea, X. Ma, and G. Trinchieri. 1995. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* 25:1.
11. Tone, Y., S. A. Thompson, J. M. Babik, K. F. Nolan, M. Tone, C. Raven, and H. Waldmann. 1996. Structure and chromosomal location of the mouse interleukin-12 p35 and p40 subunit genes. *Eur J Immunol* 26:1222.
12. Yoshimoto, T., K. Kojima, T. Funakoshi, Y. Endo, T. Fujita, and H. Nariuchi. 1996. Molecular cloning and characterization of murine IL-12 genes. *J Immunol* 156:1082.
13. Wolf, S., P. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, and R. Hewick. 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 146:3074.
14. Gubler, U., A. Chua, D. Schoenhaut, C. Dwyer, W. McComas, R. Motyka, N. Nabavi, A. Wolitzky, P. Quinn, P. c. Familletti, and M. Gately. 1991. Coexpression of Two Distinct Genes is Required to Generate Secreted Bioactive Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor. *PNAS* 88:4143.
15. Gillessen, S., D. Carvajal, P. Ling, F. J. Podlaski, D. L. Stremlo, P. C. Familletti, U. Gubler, D. H. Presky, A. S. Stern, and M. K. Gately. 1995. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 25:200.

16. Praseuth, D., M. Grigoriev, A. L. Guieysse, L. L. Pritchard, A. Harel-Bellan, P. E. Nielsen, and C. Helene. 1996. Peptide nucleic acids directed to the promoter of the alpha-chain of the interleukin-2 receptor. *Biochim Biophys Acta* 1309:226.
17. Schoenhaut, D., A. Chua, A. Wolitzky, P. Quinn, C. Dwyer, W. McComas, P. Familletti, M. Gately, and U. Gubler. 1992. Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol* 148:3433.
18. Gearing, D. P., and D. Cosman. 1991. Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell* 66:9.
19. Merberg, D. M., S. F. Wolf, and S. C. Clark. 1992. Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunol Today* 13:77.
20. Presky, D. H., H. Yang, L. J. Minetti, A. O. Chua, N. Nabavi, C.-Y. Wu, M. K. Gately, and U. Gubler. 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta -type cytokine receptor subunits. *PNAS* 93:14002.
21. Wu, C.-y., X. Wang, M. Gadina, J. J. O'Shea, D. H. Presky, and J. Magram. 2000. IL-12 Receptor {beta}2 (IL-12R{beta}2)-Deficient Mice Are Defective in IL-12-Mediated Signaling Despite the Presence of High Affinity IL-12 Binding Sites. *J Immunol* 165:6221.
22. Chua, A., V. Wilkinson, D. Presky, and U. Gubler. 1995. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J Immunol* 155:4286.
23. Kaplan, M. H., Y. L. Sun, T. Hoey, and M. J. Grusby. 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382:174.
24. Kubin, M., M. Kamoun, and G. Trinchieri. 1994. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J. Exp. Med.* 180:211.
25. Murphy, E., G. Terres, S. Macatonia, C. Hsieh, J. Mattson, L. Lanier, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. Murphy, and A. O'Garra. 1994. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J. Exp. Med.* 180:223.
26. Chouaib, S., J. Chehimi, L. Bani, N. Genetet, T. Tursz, F. Gay, G. Trinchieri, and F. Mami-Chouaib. 1994. Interleukin 12 Induces the Differentiation of Major Histocompatibility Complex Class I-Primed Cytotoxic T-Lymphocyte Precursors into Allospecific Cytotoxic Effectors. *PNAS* 91:12659.
27. Perussia, B., S. Chan, A. D'Andrea, K. Tsuji, D. Santoli, M. Pospisil, D. Young, S. Wolf, and G. Trinchieri. 1992. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *J Immunol* 149:3495.
28. Lauwerys, B. R., N. Garot, J.-C. Renauld, and F. A. Houssiau. 2000. Cytokine Production and Killer Activity of NK/T-NK Cells Derived with IL-2, IL-15, or the Combination of IL-12 and IL-18. *J Immunol* 165:1847.
29. Chan, S., B. Perussia, J. Gupta, M. Kobayashi, M. Pospisil, H. Young, S. Wolf, D. Young, S. Clark, and G. Trinchieri. 1991. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 173:869.
30. Meraz, M. A., J. M. White, K. C. Sheehan, E. A. Bach, S. J. Rodig, A. S. Dighe, D. H. Kaplan, J. K. Riley, A. C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R. N. DuBois, R. Clark, M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84:431.

31. Mosmann, T., H. Cherwinski, M. Bond, M. Giedlin, and R. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348.
32. Aguet, M., and G. Merlin. 1987. Purification of human gamma interferon receptors by sequential affinity chromatography on immobilized monoclonal antireceptor antibodies and human gamma interferon. *J. Exp. Med.* 165:988.
33. Hemmi, S., R. Bohni, G. Stark, F. Di Marco, and M. Aguet. 1994. A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon gamma receptor in human cells. *Cell* 76:803.
34. Munro, S., and T. Maniatis. 1989. Expression cloning of the murine interferon gamma receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9248.
35. Walter, M. R., W. T. Windsor, T. L. Nagabhushan, D. J. Lundell, C. A. Lunn, P. J. Zauodny, and S. K. Narula. 1995. Crystal structure of a complex between interferon-[gamma] and its soluble high-affinity receptor. 376:230.
36. Ealick, S. E., W. J. Cook, S. Vijay-Kumar, M. Carson, T. L. Nagabhushan, P. P. Trotta, and C. E. Bugg. 1991. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science* 252:698.
37. Kotenko, S. V., L. S. Izotova, B. P. Pollack, T. M. Mariano, R. J. Donnelly, G. Muthukumar, J. R. Cook, G. Garotta, O. Silvennoinen, J. N. Ihle, and S. Pestka. 1995. Interaction between the Components of the Interferon [IMAGE] Receptor Complex. *J. Biol. Chem.* 270:20915.
38. Fountoulakis, M., M. Zulauf, A. Lustig, and G. Garotta. 1992. Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor. *Eur J Biochem* 208:781.
39. Sakatsume, M., and D. Finbloom. 1996. Modulation of the expression of the IFN-gamma receptor beta-chain controls responsiveness to IFN-gamma in human peripheral blood T cells. *J Immunol* 156:4160.
40. Decker, T., P. Kovarik, and A. Meinke. 1997. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 17:121.
41. Bach, E. A., M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1997. THE IFN RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annual Review of Immunology* 15:563.
42. Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I. S. Figari, A. Bradley, and T. A. Stewart. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259:1739.
43. Ma, X., J. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri. 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J. Exp. Med.* 183:147.
44. Pernis, A., S. Gupta, K. J. Gollob, E. Garfein, R. L. Coffman, C. Schindler, and P. Rothman. 1995. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science* 269:245.
45. Nandi, D., H. Jiang, and J. J. Monaco. 1996. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol* 156:2361.
46. Baldeon, M. E., D. J. Neece, D. Nandi, J. J. Monaco, and H. R. Gaskins. 1997. Interferon-gamma independently activates the MHC class I antigen processing pathway and diminishes glucose responsiveness in pancreatic beta-cell lines. *Diabetes* 46:770.
47. Malu, S., S. Srinivasan, P. Kumar Maiti, D. Rajagopal, B. John, and D. Nandi. 2003. IFN-gamma bioassay: development of a sensitive method by measuring nitric oxide production by peritoneal exudate cells from C57BL/6 mice. *J Immunol Methods* 272:55.

48. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON-. *Annual Review of Immunology* 15:749.
49. Parr, M. B., and E. L. Parr. 2000. Immunity to vaginal herpes simplex virus-2 infection in B-cell knockout mice. *Immunology* 101:126.
50. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, and K. Singh. 2000. Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* 13:715.
51. Parham, C., M. Chirica, J. Timans, E. Vaisberg, M. Travis, J. Cheung, S. Pflanz, R. Zhang, K. P. Singh, F. Vega, W. To, J. Wagner, A.-M. O'Farrell, T. McClanahan, S. Zurawski, C. Hannum, D. Gorman, D. M. Rennick, R. A. Kastelein, R. de Waal Malefyt, and K. W. Moore. 2002. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12R{beta}1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. *J Immunol* 168:5699.
52. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.-H. Xie, F. J. de Sauvage, and A. L. Gurney. 2003. Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278:1910.
53. Hunter, C. A. 2005. NEW IL-12-FAMILY MEMBERS: IL-23 AND IL-27, CYTOKINES WITH DIVERGENT FUNCTIONS. *Nature Reviews Immunology Nat Rev Immunol* 5:521.
54. Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, and E. Vaisberg. 2002. IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *Immunity* 16:779.
55. Lucas, S., N. Ghilardi, J. Li, and F. J. de Sauvage. 2003. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *PNAS* 100:15047.
56. Brombacher, F., R. A. Kastelein, and G. Alber. 2003. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends in Immunology* 24:207.
57. Magram, J., S. E. Connaughton, R. R. Warrier, D. M. Carvajal, C.-y. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D. A. Faherty, and M. K. Gately. 1996. IL-12-Deficient Mice Are Defective in IFN[gamma] Production and Type 1 Cytokine Responses. *Immunity* 4:471.
58. Mattner, F., J. Magram, J. Ferrante, P. Launois, K. Di Padova, R. Behin, M. K. Gately, J. A. Louis, and G. Alber. 1996. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol* 26:1553.
59. Yap, G., M. Pesin, and A. Sher. 2000. Cutting Edge: IL-12 Is Required for the Maintenance of IFN-{\gamma} Production in T Cells Mediating Chronic Resistance to the Intracellular Pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 165:628.
60. Park, A. Y., B. D. Hondowicz, and P. Scott. 2000. IL-12 Is Required to Maintain a Th1 Response During *Leishmania major* Infection. *J Immunol* 165:896.
61. Cooper, A. M., J. Magram, J. Ferrante, and I. M. Orme. 1997. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186:39.
62. Lehmann, J., S. Bellmann, C. Werner, R. Schroder, N. Schutze, and G. Alber. 2001. IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against *Salmonella enteritidis*. *J Immunol* 167:5304.
63. Cooper, A. M., A. Kipnis, J. Turner, J. Magram, J. Ferrante, and I. M. Orme. 2002. Mice Lacking Bioactive IL-12 Can Generate Protective, Antigen-Specific Cellular

- Responses to Mycobacterial Infection Only if the IL-12 p40 Subunit Is Present. *J Immunol* 168:1322.
64. Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259:1742.
  65. Lu, B., C. Ebensperger, Z. Dembic, Y. Wang, M. Kvatyuk, T. Lu, R. L. Coffman, S. Pestka, and P. B. Rothman. 1998. Targeted disruption of the interferon-gamma receptor 2 gene results in severe immune defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8233.
  66. Huang, H., Y. Mizukami, Y. Hu, and H. Ma. 1993. Isolation and characterization of the binding sequences for the product of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS. *Nucleic Acids Res* 21:4769.
  67. Shore, P., and A. D. Sharrocks. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* 229:1.
  68. Norman, C., M. Runswick, R. Pollock, and R. Treisman. 1988. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55:989.
  69. Affolter, M., J. Montagne, U. Walldorf, J. Groppe, U. Kloter, M. LaRosa, and W. J. Gehring. 1994. The Drosophila SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development* 120:743.
  70. Kemp, P. R., and J. C. Metcalfe. 2000. Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity. *Biochem J* 345 Pt 3:445.
  71. Treisman, R. 1987. Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *Embo J* 6:2711.
  72. Boxer, L. M., R. Prywes, R. G. Roeder, and L. Kedes. 1989. The sarcomeric actin CArG-binding factor is indistinguishable from the c-fos serum response factor. *Mol Cell Biol* 9:515.
  73. Rivera, V. M., C. K. Miranti, R. P. Misra, D. D. Ginty, R. H. Chen, J. Blenis, and M. E. Greenberg. 1993. A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 13:6260.
  74. Treisman, R. 1994. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Current Opinion in Genetics & Development* 4:96.
  75. Belaguli, N. S., W. Zhou, T. H. Trinh, M. W. Majesky, and R. J. Schwartz. 1999. Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets. *Mol Cell Biol* 19:4582.
  76. Camoretti-Mercado, B., H. W. Liu, A. J. Halayko, S. M. Forsythe, J. W. Kyle, B. Li, Y. Fu, J. McConville, P. Kogut, J. E. Vieira, N. M. Patel, M. B. Hershenson, E. Fuchs, S. Sinha, J. M. Miano, M. S. Parmacek, J. K. Burkhardt, and J. Solway. 2000. Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor. *J Biol Chem* 275:30387.
  77. Shaw, P. E., H. Schroter, and A. Nordheim. 1989. The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell* 56:563.
  78. Schroter, H., C. G. Mueller, K. Meese, and A. Nordheim. 1990. Synergism in ternary complex formation between the dimeric glycoprotein p67SRF, polypeptide p62TCF and the c-fos serum response element. *Embo J* 9:1123.

79. Janknecht, R., R. A. Hipskind, T. Houthaeve, A. Nordheim, and H. G. Stunnenberg. 1992. Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. *Embo J* 11:1045.
80. Dalton, S., and R. Treisman. 1992. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 68:597.
81. Yang, S. H., P. Shore, N. Willingham, J. H. Lakey, and A. D. Sharrocks. 1999. The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Embo J* 18:5666.
82. Yates, P. R., G. T. Atherton, R. W. Deed, J. D. Norton, and A. D. Sharrocks. 1999. Id helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF ETS-domain transcription factors. *Embo J* 18:968.
83. Bebien, M., S. Salinas, C. Becamel, V. Richard, L. Linares, and R. A. Hipskind. 2003. Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene* 22:1836.
84. Hill, C. S., J. Wynne, and R. Treisman. 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81:1159.
85. Sotiropoulos, A., D. Gineitis, J. Copeland, and R. Treisman. 1999. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98:159.
86. Posern, G., A. Sotiropoulos, and R. Treisman. 2002. Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell* 13:4167.
87. Miralles, F., G. Posern, A. I. Zaromytidou, and R. Treisman. 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113:329.
88. Miranti, C. K., D. D. Ginty, G. Huang, T. Chatila, and M. E. Greenberg. 1995. Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* 15:3672.
89. Misra, R., A. Bonni, C. Miranti, V. Rivera, M. Sheng, and M. Greenberg. 1994. L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 269:25483.
90. Spencer, J. A., and R. P. Misra. 1996. Expression of the serum response factor gene is regulated by serum response factor binding sites. *J Biol Chem* 271:16535.
91. Zhang, X., G. Azhar, J. Chai, P. Sheridan, K. Nagano, T. Brown, J. Yang, K. Khrapko, A. M. Borrás, J. Lawitts, R. P. Misra, and J. Y. Wei. 2001. Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H1782.
92. Miano, J. M. 2003. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35:577.
93. Stringer, J. L., N. S. Belaguli, D. Iyer, R. J. Schwartz, and A. Balasubramanyam. 2002. Developmental expression of serum response factor in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 138:81.
94. Wang, D. Z., and E. N. Olson. 2004. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr Opin Genet Dev* 14:558.
95. Pierce, J. W., C. A. Jamieson, J. L. Ross, and R. Sen. 1995. Activation of IL-2 receptor alpha-chain gene by individual members of the rel oncogene family in association with serum response factor. *J Immunol* 155:1972.
96. Niiró, H., and E. A. Clark. 2002. REGULATION OF B-CELL FATE BY ANTIGEN-RECEPTOR SIGNALS. *Nature Reviews Immunology*

*Nat Rev Immunol* 2:945.

97. Hao, S., T. Kurosaki, and A. August. 2003. Differential regulation of NFAT and SRF by the B cell receptor via a PLCgamma-Ca(2+)-dependent pathway. *Embo J* 22:4166.
98. Charvet, C., P. Auberger, S. Tartare-Deckert, A. Bernard, and M. Deckert. 2002. Vav1 couples T cell receptor to serum response factor-dependent transcription via a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem* 277:15376.
99. Mora-Garcia, P., and K. M. Sakamoto. 2000. Granulocyte colony-stimulating factor induces Egr-1 up-regulation through interaction of serum response element-binding proteins. *J Biol Chem* 275:22418.
100. Costello, P. S., R. H. Nicolas, Y. Watanabe, I. Rosewell, and R. Treisman. 2004. Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection. 5:289.
101. Glassford, J., M. Holman, L. Banerji, E. Clayton, G. G. B. Klaus, M. Turner, and E. W.-F. Lam. 2001. Vav Is Required for Cyclin D2 Induction and Proliferation of Mouse B Lymphocytes Activated via the Antigen Receptor. *J. Biol. Chem.* 276:41040.
102. Tarakhovsky, A., M. Turner, S. Schaal, P. J. Mee, L. P. Duddy, K. Rajewsky, and V. L. Tybulewicz. 1995. Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* 374:467.
103. Vickers, E. R., A. Kasza, I. A. Kurnaz, A. Seifert, L. A. Zeef, A. O'Donnell, A. Hayes, and A. D. Sharrocks. 2004. Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 24:10340.
104. Townsend, K. J., P. Zhou, L. Qian, C. K. Bieszczad, C. H. Lowrey, A. Yen, and R. W. Craig. 1999. Regulation of MCL1 through a serum response factor/Elk-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the BCL2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J Biol Chem* 274:1801.
105. Schratt, G., U. Philippar, D. Hockemeyer, H. Schwarz, S. Alberti, and A. Nordheim. 2004. SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. *Embo J* 23:1834.
106. Arsenian, S., B. Weinhold, M. Oelgeschlager, U. Ruther, and A. Nordheim. 1998. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Embo J* 17:6289.
107. Weinhold, B., G. Schratt, S. Arsenian, J. Berger, K. Kamino, H. Schwarz, U. Ruther, and A. Nordheim. 2000. Srf-/- ES cells display non-cell-autonomous impairment in mesodermal differentiation. *EMBO J.* 19:5835.
108. Schratt, G., U. Philippar, J. Berger, H. Schwarz, O. Heidenreich, and A. Nordheim. 2002. Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 156:737.
109. Abremski, K., and R. Hoess. 1984. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* 259:1509.
110. Hoess, R. H., M. Ziese, and N. Sternberg. 1982. P1 Site-Specific Recombination: Nucleotide Sequence of the Recombining Sites. *PNAS* 79:3398.
111. Sauer, B., and N. Henderson. 1988. Site-Specific DNA Recombination in Mammalian Cells by the Cre Recombinase of Bacteriophage P1. *PNAS* 85:5166.
112. Austin, S., M. Ziese, and N. Sternberg. 1981. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25:729.
113. Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann, and K. Rajewsky. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103.



114. Dymecki, S. M. 1996. FLP recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *PNAS* 93:6191.
115. Broach, J. R., and J. B. Hicks. 1980. Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell* 21:501.
116. Matsuzaki, H., H. Araki, and Y. Oshima. 1988. Gene conversion associated with site-specific recombination in yeast plasmid pSR1. *Mol Cell Biol* 8:955.
117. Ringrose, L., V. Lounnas, L. Ehrlich, F. Buchholz, R. Wade, and A. F. Stewart. 1998. Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *Journal of Molecular Biology* 284:363.
118. Buchholz, F., L. Ringrose, P. Angrand, F. Rossi, and A. Stewart. 1996. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucl. Acids Res.* 24:4256.
119. Buchholz, F., P. O. Angrand, and A. F. Stewart. 1998. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 16:657.
120. Rodriguez, C. I., F. Buchholz, J. Galloway, R. Sequerra, J. Kasper, R. Ayala, A. F. Stewart, and S. M. Dymecki. 2000. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139.
121. Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet, and K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269:1427.
122. Rickert, R., J. Roes, and K. Rajewsky. 1997. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucl. Acids Res.* 25:1317.
123. Zhang, Y., F. Buchholz, J. P. Muylers, and A. F. Stewart. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* 20:123.
124. Hall, S. D., M. F. Kane, and R. D. Kolodner. 1993. Identification and characterization of the *Escherichia coli* RecT protein, a protein encoded by the recE region that promotes renaturation of homologous single-stranded DNA. *J Bacteriol* 175:277.
125. Kolodner, R., S. D. Hall, and C. Luisi-DeLuca. 1994. Homologous pairing proteins encoded by the *Escherichia coli* recE and recT genes. *Mol Microbiol* 11:23.
126. Hall, S. D., and R. D. Kolodner. 1994. Homologous pairing and strand exchange promoted by the *Escherichia coli* RecT protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3205.
127. Yu, D., H. M. Ellis, E.-C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and D. L. Court. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *PNAS* 97:5978.
128. Kushner, S. R., H. Nagaishi, A. Templin, and A. J. Clark. 1971. Genetic recombination in *Escherichia coli*: the role of exonuclease I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:824.
129. Muylers, J. P. P., Y. Zhang, F. Buchholz, and A. F. Stewart. 2000. RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev.* 14:1971.
130. Muylers, J. P. P., Y. Zhang, and A. F. Stewart. 2001. Techniques: Recombinogenic engineering-new options for cloning and manipulating DNA. *Trends in Biochemical Sciences* 26:325.
131. Murphy, K. C. 1991. Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J Bacteriol* 173:5808.
132. Muylers, J., Y. Zhang, G. Testa, and A. Stewart. 1999. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET- recombination. *Nucl. Acids Res.* 27:1555.
133. Muller, W., R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1991. Major histocompatibility complex class II hyperexpression on B cells in interleukin 4-transgenic mice does not lead to B cell proliferation and hypergammaglobulinemia. *Eur J Immunol* 21:921.

134. Sambrook J., F. E. F., Maniatis T.,. 1989. *Molecular cloning-a laboratory manual*, 2. edition.
135. Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch, and A. Berns. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19:4293.
136. Schlieper, D., B. von Wilcken-Bergmann, M. Schmidt, H. Sobek, and B. Muller-Hill. 1998. A positive selection vector for cloning of long polymerase chain reaction fragments based on a lethal mutant of the crp gene of Escherichia coli. *Anal Biochem* 257:203.
137. Buchholz, F., P. Angrand, and A. Stewart. 1996. A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucl. Acids Res.* 24:3118.
138. Rickert, R. C., K. Rajewsky, and J. Roes. 1995. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 376:352.
139. Dialynas, D. P., Z. S. Quan, K. A. Wall, A. Pierres, J. Quintans, M. R. Loken, M. Pierres, and F. W. Fitch. 1983. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. *J Immunol* 131:2445.
140. Ledbetter, J. A., and L. A. Herzenberg. 1979. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol Rev* 47:63.
141. Mendrick, D. L., and D. M. Kelly. 1993. Temporal expression of VLA-2 and modulation of its ligand specificity by rat glomerular epithelial cells in vitro. *Lab Invest* 69:690.
142. Kilshaw, P. J., and S. J. Murant. 1991. Expression and regulation of beta 7(beta p) integrins on mouse lymphocytes: relevance to the mucosal immune system. *Eur J Immunol* 21:2591.
143. Strauch, U. G., A. Lifka, U. Gossler, P. J. Kilshaw, J. Clements, and B. Holzmann. 1994. Distinct binding specificities of integrins alpha 4 beta 7 (LPAM-1), alpha 4 beta 1 (VLA-4), and alpha IEL beta 7. *Int Immunol* 6:263.
144. Krop, I., A. R. de Fougères, R. R. Hardy, M. Allison, M. S. Schlissel, and D. T. Fearon. 1996. Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19. *Eur J Immunol* 26:238.
145. Arase, H., T. Saito, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 2001. Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol* 167:1141.
146. Austyn, J. M., and S. Gordon. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11:805.
147. Hestdal, K., F. W. Ruscetti, J. N. Ihle, S. E. Jacobsen, C. M. Dubois, W. C. Kopp, D. L. Longo, and J. R. Keller. 1991. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 147:22.
148. Xu, H., J. K. Bickford, E. Luther, C. Carpenito, F. Takei, and T. A. Springer. 1996. Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2. *J Immunol* 156:4909.
149. Symington, F. W., B. Subbarao, D. E. Mosier, and J. Sprent. 1982. Lyb-8.2: A new B cell antigen defined and characterized with a monoclonal antibody. *Immunogenetics* 16:381.
150. Forster, R., E. Kremmer, A. Schubel, D. Breitfeld, A. Kleinschmidt, C. Nerl, G. Bernhardt, and M. Lipp. 1998. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol* 160:1522.

151. Kato, K., M. Koyanagi, H. Okada, T. Takanashi, Y. W. Wong, A. F. Williams, K. Okumura, and H. Yagita. 1992. CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J Exp Med* 176:1241.
152. Roes, J., W. Muller, and K. Rajewsky. 1995. Mouse anti-mouse IgD monoclonal antibodies generated in IgD-deficient mice. *Journal of Immunological Methods* 183:231.
153. Leptin, M., and F. Melchers. 1983. A monoclonal antibody with specificity for murine mu heavy chain which inhibits the formation of antigen-specific direct IgM plaques. *J Immunol Methods* 59:53.
154. Kanayama, N., M. Cascalho, and H. Ohmori. 2005. Analysis of marginal zone B cell development in the mouse with limited B cell diversity: role of the antigen receptor signals in the recruitment of B cells to the marginal zone. *J Immunol* 174:1438.
155. Schlake, T., and J. Bode. 1994. Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33:12746.
156. Ebensperger, C., S. Rhee, G. Muthukumaran, D. Lembo, R. Donnelly, S. Pestka, and Z. Dembic. 1996. Genomic organization and promoter analysis of the gene *ifngr2* encoding the second chain of the mouse interferon-gamma receptor. *Scand J Immunol* 44:599.
157. Muthukumaran, G., R. J. Donnelly, C. Ebensperger, T. M. Mariano, G. Garotta, Z. Dembic, J. Poast, S. Baron, and S. Pestka. 1996. The intracellular domain of the second chain of the interferon-gamma receptor is interchangeable between species. *J Interferon Cytokine Res* 16:1039.
158. Zhang, H., L. Wang, S. Kao, I. P. Whitehead, M. J. Hart, B. Liu, K. Duus, K. Burrige, C. J. Der, and L. Su. 1999. Functional interaction between the cytoplasmic leucine-zipper domain of HIV-1 gp41 and p115-RhoGEF. *Curr Biol* 9:1271.
159. Berland, R., and H. H. Wortis. 2002. ORIGINS AND FUNCTIONS OF B-1 CELLS WITH NOTES ON THE ROLE OF CD5. *Annual Review of Immunology* 20:253.
160. Weinhold, B., G. Schratt, S. Arsenian, J. Berger, K. Kamino, H. Schwarz, U. Ruther, and A. Nordheim. 2000. Srf(-/-) ES cells display non-cell-autonomous impairment in mesodermal differentiation. *Embo J* 19:5835.
161. Parker, C., K. Cepek, G. Russell, S. Shaw, D. Posnett, R. Schwarting, and M. Brenner. 1992. A Family of {beta}7 Integrins on Human Mucosal Lymphocytes. *PNAS* 89:1924.
162. Wagner, N., J. Lohler, E. J. Kunkel, K. Ley, E. Leung, G. Krissansen, K. Rajewsky, and W. Muller. 1996. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382:366.
163. Nitschke, L., R. Carsetti, B. Ocker, G. Kohler, and M. C. Lamers. 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 7:133.
164. Nitschke, L., and T. Tsubata. 2004. Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. *Trends in Immunology* 25:543.
165. Samardzic, T., D. Marinkovic, C. P. Danzer, J. Gerlach, L. Nitschke, and T. Wirth. 2002. Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice. *Eur J Immunol* 32:561.
166. Lu, M., E. A. Grove, and R. J. Miller. 2002. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7090.
167. Nie, Y., J. Waite, F. Brewer, M.-J. Sunshine, D. R. Littman, and Y.-R. Zou. 2004. The Role of CXCR4 in Maintaining Peripheral B Cell Compartments and Humoral Immunity. *J. Exp. Med.* 200:1145.

168. de Fougerolles, A. R., S. A. Stacker, R. Schwarting, and T. A. Springer. 1991. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* 174:253.
169. Diacovo, T. G., A. R. deFougerolles, D. F. Bainton, and T. A. Springer. 1994. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 94:1243.
170. Perez, O. D., S. Kinoshita, Y. Hitoshi, D. G. Payan, T. Kitamura, G. P. Nolan, and J. B. Lorens. 2002. Activation of the PKB/AKT Pathway by ICAM-2. *Immunity* 16:51.
171. Garnett, D., and A. F. Williams. 1994. Homotypic adhesion of rat B cells, but not T cells, in response to cross-linking of CD48. *Immunology* 81:103.
172. Genaro, A. M., J. A. Gonzalo, L. Bosca, and C. Martinez. 1994. CD2-CD48 interaction prevents apoptosis in murine B lymphocytes by up-regulating bcl-2 expression. *Eur J Immunol* 24:2515.
173. Jurka, J., P. Klonowski, V. Dagman, and P. Pelton. 1996. CENSOR--a program for identification and elimination of repetitive elements from DNA sequences. *Comput Chem* 20:119.
174. Hastay, P., J. Rivera-Perez, and A. Bradley. 1991. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:5586.
175. Deng, C., and M. R. Capecchi. 1992. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 12:3365.
176. Yang, Y., and B. Seed. 2003. Site-specific gene targeting in mouse embryonic stem cells with intact bacterial artificial chromosomes. *Nat Biotechnol* 21:447.
177. Mir, B., and J. A. Piedrahita. 2004. Nuclear localization signal and cell synchrony enhance gene targeting efficiency in primary fetal fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 32:e25.
178. Kaptein, J. S., C. L. Yang, C. K. Lin, T. T. Nguyen, F. S. Chen, and P. M. Lad. 1995. Synergy between signal transduction pathways is obligatory for expression of c-fos in B and T cell lines: implication for c-fos control via surface immunoglobulin and T cell antigen receptors. *Immunobiology* 193:465.
179. Ramanan, N., Y. Shen, S. Sarsfield, T. Lemberger, G. Schutz, D. J. Linden, and D. D. Ginty. 2005. SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. 8:759.
180. Martin, F., and J. F. Kearney. 2000. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev* 175:70.
181. Lam, K.-P., and K. Rajewsky. 1999. B Cell Antigen Receptor Specificity and Surface Density Together Determine B-1 versus B-2 Cell Development. *J. Exp. Med.* 190:471.
182. Alberti, S., S. M. Krause, O. Kretz, U. Philippar, T. Lemberger, E. Casanova, F. F. Wiebel, H. Schwarz, M. Frotscher, G. Schutz, and A. Nordheim. 2005. Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *PNAS* 102:6148.
183. Pillai, S., A. Cariappa, and S. T. Moran. 2005. MARGINAL ZONE B CELLS. *Annual Review of Immunology* 23:161.
184. Yamashita, K., A. Sakamoto, Y. Ohkubo, M. Arima, M. Hatano, Y. Kuroda, and T. Tokuhi. 2005. c-fos Overexpression in splenic B cells augments development of marginal zone B cells. *Molecular Immunology* 42:617.
185. Bradbury, L. E., G. S. Kansas, S. Levy, R. L. Evans, and T. F. Tedder. 1992. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol* 149:2841.

186. Matsumoto, A. K., J. Kopicky-Burd, R. H. Carter, D. A. Tuveson, T. F. Tedder, and D. T. Fearon. 1991. Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J Exp Med* 173:55.
187. Otero, D. C., A. N. Anzelon, and R. C. Rickert. 2003. CD19 Function in Early and Late B Cell Development: I. Maintenance of Follicular and Marginal Zone B Cells Requires CD19-Dependent Survival Signals. *J Immunol* 170:73.
188. Martin, F., and J. F. Kearney. 2000. Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 12:39.
189. Muehlinghaus, G., L. Cigliano, S. Huehn, A. Peddinghaus, H. Leyendeckers, A. E. Hauser, F. Hiepe, A. Radbruch, S. Arce, and R. A. Manz. 2005. Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood* 105:3965.
190. Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson, and T. A. Springer. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *PNAS* 95:9448.
191. Fagarasan, S., N. Watanabe, and T. Honjo. 2000. Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev* 176:205.
192. Hayakawa, K., M. Asano, S. A. Shinton, M. Gui, D. Allman, C. L. Stewart, J. Silver, and R. R. Hardy. 1999. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285:113.
193. Tedford, K., L. Nitschke, I. Girkontaite, A. Charlesworth, G. Chan, V. Sakk, M. Barbacid, and K. D. Fischer. 2001. Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling. *Nat Immunol* 2:548.
194. Moriuchi, M., H. Moriuchi, W. Turner, and A. Fauci. 1997. Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol* 159:4322.
195. Otero, D. C., S. A. Omori, and R. C. Rickert. 2001. CD19-dependent Activation of Akt Kinase in B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 276:1474.
196. van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research* 305:285.

## 6 Anhang

### 6.1 Primer für II-12p40

Alle Primer sind in 5' nach 3' Orientierung angegeben.

#### 6.1.1 Sequenzierungsprimer

**IIEx2a:** ggaaggcagataagctgttg  
**IIEx2b:** taatcctggtccaacagtgtg  
**IIEx3a:** gccaaactcctgtgagctatg  
**IIEx3b:** catgccctgagatctctcag  
**IIEx4b rv:** cattaccagtcactgataatc  
**IIEx5a:** ctggagaaatccaaccagctg  
**IIEx5b rv:** cagacatcgtctttgcttcc  
**IIEx6a :** gatgctcagagaagtgaaagag  
**IIEx6b:** gaaagatcactctcagcag

#### 6.1.2 Primer zur Verifizierung der BACs und der Subklonierung

**Primer 51:** gacacgcctgaagaagatgac

**Primer 52:** cccttacctgctactgctcttg

Diese Primer dienen ebenfalls zur Erzeugung einer 680 bp langen genspezifischen Sonde für die Koloniehybridisierung.

### 6.1.3 ET Klonierungsprimer

#### ET IL12pCAPs1:

agtggcttctgacaaggaatcttgctgtttgcatcttttctgttcagaattcctgtgcagacaaacgcatcaggat  
(EcoRI)

#### ET IL12pCAPs2 :

actggcaggtggccagtaataatcggctctctgattaggaagggaagacctcgccaattgattcaggtaaaccggat

#### Ilneofrt1 :

caaaggcagccagtattgctgtcacctctccacagaggccaggaaagctcataacttcgtatagcatacattatacgaagtta  
ctgcgatcgctagggtaacc (loxP)

#### Ilneofrtpr2

gttctgccactgctctagctggaagaacgtgggcaaacatagcctctct tggaaaagctggcgcgccgctcgc

### 6.1.4 Primer zur Verlängerung des 3' Arms

**IL12 5'BamHI:** cccgatccaggagcctataatgattgtttaaactgag  
(BamHI)

**IL12<sup>+</sup>1kb:** cgc cgg ggc aat ata agg cag gct ggc  
(SacII)

### 6.1.5 Primer zur Erzeugung der 5' und 3' Sonde

5' Probe: **Primer4 5'**: ggctagattctggatataaga

**Primer5 3'**: cttgtacttgcttgactatatg

Die Primer liefern eine Sonde von 1,3 kb

3' Probe: **ILPrimer1 3'**: ctctgattatagcttctaccag

**ILPrimer 2 3'**: aagcctctgtgtcctccaccag

Die Primer liefern eine Sonde von 301 bp

## 6.2 Primer für Ifngr2

### 6.2.1 Sequenzierungsprimer

**IFEx2a:** cagagctgtgtgaataaatg

**IFEx2b:** caacaggcacggaaacattgttg

**IFEx3a:** gagtttctgtatgtgaccttg

**IFEx3b:** gcagcgatgacctaatctag

**IFEx4a:** cattgcgagtgaagtgtgaacg

**IFEx4b:** gtaaacctctgttcagaacgg

**IFEx5a:** gtggattgaggagtcactag

**IFEx6a:** taagcgcatattgaggcaag

**IFEx6b :** tgtgtattatgacagggcag

### 6.2.2 Primer zur Verifizierung der BACs

**Primer 11:** aacatctcggtgaccccagg

**Primer 12:** ggcttcagattgccagcac

### 6.2.3 ET Klonierungsprimer

**IFneoloP1:**

ctcaatgatgcggtaaatgttatatcacactgtcacttagtctgtttaccatggcgcaacgcaattaatg

**IFneoloP2:**

cgaggatccagctaccacgtccacgtggaacacgagacatgttacaggtactcgaggaactgatggcgagctcagacc

(XhoI)

**Ifneofrt1:**

caccacagttgtttctctggggcagaaatctaaggtttgctgtactttcataacttcgtatagcatacattatacgaagttat

ctgcgatgcctaggggtaacc

(loxP)

**Ifneofrt2:**

ctactctcaagtaacgtcagcagcctctggcagttcttcacactttcccaa tggaaaagctggcgccgctcgc

### 6.2.4 Primer zur Erzeugung der 5' und 3' Sonde für Southernhybridisierungen

5' Sonde      **IF5'Probe1:**      cacaaggaggtggtttcag

**IF5'Probe2rv:**      cgtacttgggaccttgctc

Länge der Sonde = 1066 bp



3' Sonde      **IF3'Probe1:**              gacaactgctcattactggc

**IF3'Probe4rv:**              ccaggatctctctacatag

Länge der Sonde: 760 bp

## **6.3 SRF Primer**

### **6.3.1 SRF Genotypisierungsprimer**

**Sbxn:** tgatattgctgaagagcttggcggc

**Sbxr:** gagattccacagaaagcaacgg

**Sbxl:** gctcgagcgggcgccagat

### **6.3.2 Cre Genotypisierungsprimer:**

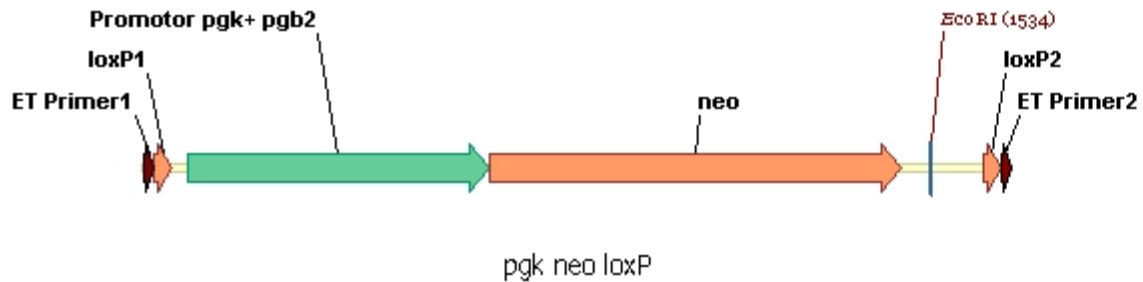
**cretot-1:** acg acc aag tga cag caa tg

**cretot-2:** ctc gac cag ttt agt tac cc

## 6.4 Matrizen für PCRs

### 6.4.1 pgkneoloxP

(Matrize für ET- Klonierung)

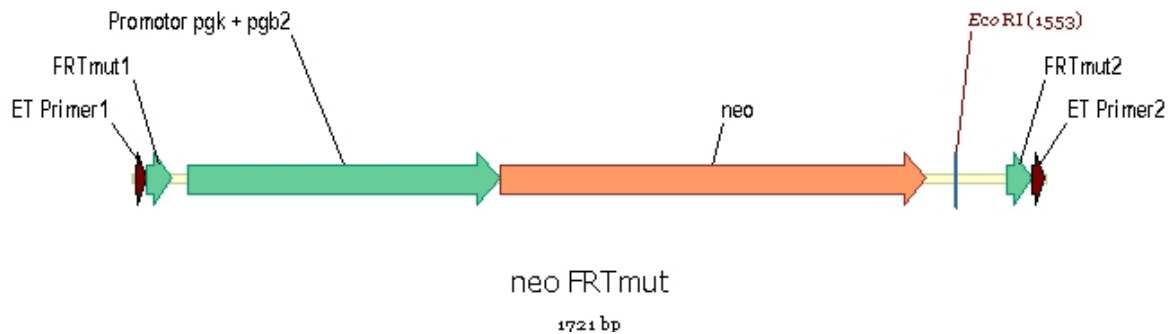


Sequenz

```
atggcgcaacgcaattaatgataacttcgtatagcatacattatacgaagtatcctaggtgtacagtttaaacgcggccgcattctaccgg
gtaggggaggcgcttttccaaggcagctctggagcatgcgcttttagcagccccgctgggcacttggcgctacacaagtggcctctggc
tcgcacacattccacatccaccgtaggcgccaaccggctccgttcttgggtggcccttcgcgccaccttctactcctccctagtcag
gaagtccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaaatggaagtagcacgtctcactagtctcgtgcagatggacag
caccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagctttgctccttcgcttctgggctcagaggctggga
aggggtgggtccggggggcgggctcagggggcgggctcagggggcggggcggggcggccgaaggctcctcggaggcccggcattct
gcacgttcaaaagcgcacgtctccgcgctgttctccttctcctcatctccgggccttctgacctgcagcagcacgtgttgacaattaat
catcgcatagtagtatcggcatagtagtaatacagacaaggtgaggaactaaaccatgggatcggccattgaacaagatggattgcacgc
aggttctccggcgcttgggtggagaggctattcggtatgactgggcacaacagacaatcggtgttctgatccgcccgtgttccggc
tgtcagcgcagggggcggcggttctttgtcaagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcaggacaggcagcgcggctatc
gtggctggccacgacgggcgttcttgcgcagctgtgctcgacgttgcactgaagcgggaagggaactggctgctattgggcgaagt
gccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgcctcgcggagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacgttg
atccggctacctgccattcgaccaccaagcgaacatcgcatcagcgagcagcgtactcggatggaagccggtcttgcgatcagg
atgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggtcaaggcgcgcatgcccgacggcgaggatct
cgtcgtgacccatggcgatgcctgcttggcgaatatcatggtggaaaatggccgcttcttggattcatcgactgtggccggctgggtgt
ggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgcttt
acggtatcggcgctcccattcgagcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctgggggttcgaataaaga
ccgaccaagcgcagctctgagagctccctggcgaattcgggtaccaataaaagagctttatctcatgatctgtgtgttgggtttgtgtcgg
cgcggcgtttaaacgcggccgccaattgtctagacaattgataacttcgtatagcatacattatacgaagtatggctctgagctcgccatca
gtt
```

### 6.4.2 pgkneoFRTmut

(Matrize für ET Klonierung)



#### Sequenz

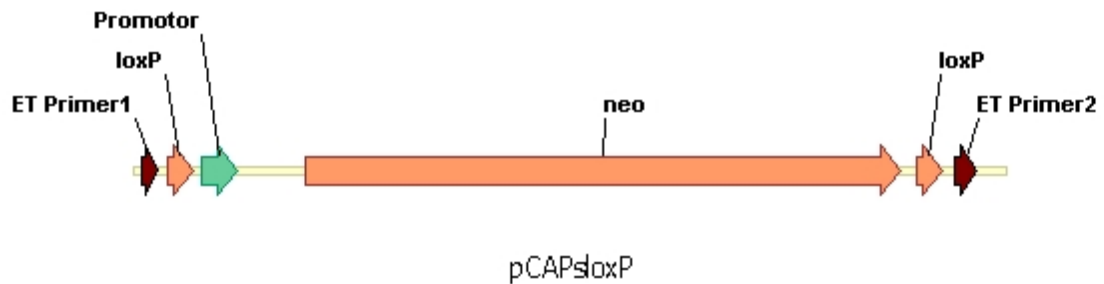
tatctcgcatcgccctaggggtaaccgaagttcctattccgaagttcctattctcaaatagtataggaacttcctaggtgtacagtttaaac  
 gcggccgcattctaccgggtaggggagggcgcttttcccaaggcagtctggagcatgcgctttagcagccccgctgggcacttggcgc  
 tacacaagtggcctctggctcgcacacattccacatccaccggtagggcgccaaccggctccgttctttgggtggcccttcgcgccacct  
 ctactctcccctagtcaggaagttccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaaatggaagtagcacgtctcactag  
 tctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagctttgctccttcgctttct  
 gggctcagaggctgggaaggggtgggtccggggcggggtcaggggcgggctcaggggcggggcgggcgcccgaaggtcctc  
 cggaggcccgccattctgcacgcttcaaaagcgcacgtctgccgcgtgttctccttctcctcatctccgggcctttcgacctgcagcag  
 cacgtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcgccatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatgggatcgccattgaac  
 aagatggattgcacgcaggttctccggcgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggtgttctgat  
 gccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcggccgggttctttgtcaagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcaggacg  
 aggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttcttgcgcagctgtgctcgcagttgtcactgaagcgggaaggactgg  
 ctgctattgggcgaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcaccttgcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcgg  
 cggctgcatacgcttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagcc  
 ggtcttgcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgatgcc  
 gacggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgcttgcgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgt  
 ggccggctgggtgtggcgaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgcaatgggctgac  
 cgcttctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgagcgcacgccttctatgccttcttgacgagttctctgagcgggactctg  
 gggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtctgagagctccctggcgaattcgggtaccaataaaaagagctttatttcatgatctgtgt  
 tggttttgtgtcggcgccgctttaaaccggcgcccaattgtctagacgaagttcctattccgaagttcctattcttcaaatagtatagg  
 aacttcgcgacggcgccgagcttttcactc

#### 6.4.2.1 mutierte FRT Sequenz (FRT3 oder auch M8)(155)

GAAGTTCCTATTCC GAAGTTCCTATTC TTCAAATA GTATAGGAACTTC

### 6.4.3 pCAPsneoloxP

(Matrize für ET Klonierung)



Sequenz:

```
gcgccatctgtgcagacaaacgcatcaggataattcgattgtgataacttcgtatagcatacattatacgaagttatcagcaagcgaacc
ggaattgccagctggggcgccctctggttaagggtgggaagccctgcaaagtaaactggatggctttctcgccccaaggatctgatgg
cgcaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccg
cttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggtctgctctgatgccgccgtgttcgggtgtcagcgcaggg
gcgcccgggtcttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacg
acggggcgttccttgccagctgtgctcgacgttgactgaagcgggaagggaaggactggctgctattggcggaagtgccggggcaggat
ctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacgcttgatccggctacctgcc
cattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggtggaagccggcttctgctgatcaggatgatctggacgaag
agcatcaggggctcgcgcagccgaactgttcgccaggtcaaggcgagcatgcccacggcgaggatctcgtcgtgacctatgg
cgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgctttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatca
ggacatagcgttggtacctgtgatattgctgaagagcttggcggcgaaatgggctgaccgcttctcgtgctttacggtatcgccgctcc
cgattcgcagcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttcttctgaattattaacgcttacaatttcataacttcgtatagcatacattatac
gaagtatctcaatcactagtgaattatccggatttacctgaatcaattggcgaaattttgtacgaaatttcagccacttcacaggcgggtt
```

## 6.5 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µl	Mikromolar
Abb.	Abbildung
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> = Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
cpm	<i>counts per minute</i> = Zerfälle pro Minute
Cre	<i>causes recombination</i> of the bacteriophage P1 genome; Rekombinationsenzym aus dem P1 Phagen
DC	Dendritic cells = Dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	fluorescens associated cell sorting
FRT	<i>Flp recognition targets</i> , Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase
<i>et al.</i>	<i>et alterae</i> = und andere
g	Erdbeschleunigung
G418R	Geneticin (Neomycin-Derivat)
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating-factor</i>
IFN	Interferon
<i>Ifngr2</i>	Gen der zweiten Kette des Interferon gamma Rezeptors
IL	Interleukin
JAK	Januskinase, Familie von Rezeptor-assoziierten Kinasen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
loxP	<i>locus of crossing over(=x) in P1</i> , Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase
LIF	Leukämie inhibierender Faktor

M	molar (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
<i>neo</i>	Neomycin
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> = Phosphat-gepufferte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> = Natriumdodecylsulfat
SRF	<i>serum response factor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
WT	Wildtyp

## **Danksagung**

Ich möchte mich als erstes bei Dr. Werner Müller für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit sowie für interessante fachliche und auch nicht fachliche Diskussionen bedanken.

Prof. Dr. Wehland danke ich für die Übernahme der Begutachtung, sowie für die Betreuung der Arbeit als Mitglied meines Thesis-Komitees.

Prof. Dr. S. Dübel danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Angela Schippers hat maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Für die Einarbeitung in das Thema SRF, die Unterstützung bei vielen Arbeiten und den fachlichen und moralischen Beistand möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Martin Hafner, der mich in die Welt des Klonierens eingeführt hat, gebührt mein Dank für die große kompetente Unterstützung in allen Fragen der Erzeugung von Konstrukten. Darüber hinaus möchte ich mich natürlich auch für die herzliche und persönliche Betreuung, die große Hilfsbereitschaft bei Problemen aller Art und nicht zuletzt für die Korrektur von Teilen dieser Arbeit bedanken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe EI, die sich alle durch große Hilfsbereitschaft und vielfältige Unterstützung ausgezeichnet haben, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen. Ganz besonders haben mich Dr. Ulla Frischmann in FACS-Angelegenheiten und Anke Samuels in Zellkulturfragen unterstützt

Lothar Gröbe danke ich für die vielen FACS-Sortierungen

Meiner Mutter möchte ich für die große, liebevolle Unterstützung in allen Bereichen sowie die vielen schönen Wochenenden bedanken, die dazu beigetragen haben, Dinge mit etwas mehr Abstand zu betrachten.

Meinem Vater, der sicher sehr stolz auf mich wäre, danke ich für das in mich gesetzte große Vertrauen.

Manou danke ich für eine wundervolle Freundschaft.

Frank danke ich für alles.